

**Aus dem Institut für Tierphysiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierphysiologie**

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

**Etablierung
der RCAS-Gentransfertechnologie
zur Durchführung
funktionell-genomischer
Studien beim Haushuhn**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Katharina Schenk-Weibhauser
aus Traunstein

München 2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Koreferenten: Univ.-Prof. Dr. Wolf
Univ.-Prof. Dr. Förster
Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Univ.-Prof. Dr. Korbel

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG.....	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 FUNKTIONELL-GENOMISCHE STUDIEN BEIM HAUSHUHN	3
2.1.1 Das retrovirale Vektorsystem RCAS.....	4
2.1.1.1 Kurze Einführung in die Biologie der Retroviren	4
2.1.1.2 Entwicklung des RCAS-Vektorsystems.....	8
2.1.1.3 Einsatz des RCAS-Systems.....	11
2.1.1.4 Anwendung des RCAS-Systems im Mausmodell.....	16
2.1.1.5 Umgang mit RCAS	17
2.1.2 Weitere Möglichkeiten für die Durchführung funktionell-genomischer Studien beim Huhn	18
2.1.2.1 Viraler Gentransfer	19
2.1.2.2 DNA Mikroinjektion.....	22
2.1.2.3 Zellbasierte Techniken.....	23
2.2 DIE ROLLE VON ZYTOKINEN IN DER ENTWICKLUNG VON B-ZELLEN.....	25
2.2.1 Das Zytokin BAFF	26
2.2.1.1 BAFF bei Mensch und Maus	27
2.2.1.2 Das Zytokin chBAFF beim Huhn	29
2.2.2 Das CD40/CD40L-System	32
2.2.2.1 Das CD40/CD40L-System in der B-Zell-Entwicklung bei Mensch und Maus.....	32
2.2.2.2 Das CD40/CD40L-System in der B-Zell-Entwicklung des Huhns	36
3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	38
4 MATERIAL UND METHODEN	39
4.1 TIERE UND TIERHALTUNG	39
4.2 ZELLEN UND ZELLKULTUR.....	39
4.2.1 Gewinnung von primären Hühnerzellen.....	39
4.2.1.1 Material.....	39
4.2.1.2 Gewinnung von Blutleukozyten.....	40
4.2.1.3 Gewinnung von Leukozyten aus Organen	40
4.2.1.4 Gewinnung von primären Hühnerembryofibroblasten (HEF).....	41
4.2.2 Zellkultur	41
4.2.2.1 Zellkulturmedien und Zusätze.....	41
4.2.2.2 Verwendete Zelllinien.....	42
4.2.2.3 Kultivierung von Zellen	42
4.2.2.4 Einfrieren von Zellen	43
4.2.2.5 Auftauen von Zellen.....	43
4.2.2.6 Proliferations-Inhibitions-Assay	43
4.3 VEKTOREN UND KLONIERUNG	44
4.3.1 Verwendete Konstrukte	44
4.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	47
4.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	48
4.3.4 Aufreinigung von DNA.....	49
4.3.5 Restriktionsenzymverdau von Vektor und Insert	49
4.3.6 Dephosphorylierung des Vektors	50
4.3.7 Ligation von Insert und Vektor	51
4.3.8 Transformation von Bakterien.....	52
4.3.9 Testung von Bakterienkolonien.....	53

4.3.9.1	Bakterien PCR	53
4.3.9.2	Aufreinigung von Plasmid	54
4.3.9.3	Überprüfung der Orientierung.....	55
4.4	TRANSFEKTION VON ZELLEN	55
4.4.1	Transfektion von 293-T Zellen.....	55
4.4.2	Transfektion von primären Hühnerembryofibroblasten	56
4.5	INFEKTION VON HÜHNEREMBRYONEN	57
4.5.1	Vorbereitung der Zellen	57
4.5.2	Injektion in embryonierte Eier.....	58
4.6	IMMUNISIERUNG	58
4.7	ELISA	59
4.7.1	Material	59
4.7.2	Durchführung	60
4.7.2.1	huFc-ELISA	61
4.7.2.2	chCD40-ELISA	61
4.7.2.3	chCD40L-ELISA	61
4.7.2.4	chBAFF-Flag-ELISA	62
4.7.2.5	Hühner-Immunglobulin-ELISA	63
4.7.2.6	ELISA zum Nachweis von KLH-spezifischem Immunglobulin	65
4.8	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	65
4.8.1	Material	65
4.8.2	Durchführung	67
4.8.2.1	Doppelfärbung	67
4.8.2.2	Dreifachfärbung	67
4.8.2.3	chCD40-Fc Inhibition	68
4.8.2.4	Zytoplasmatische Färbung zum Nachweis von Virusprotein	69
4.8.2.5	Durchflusszytometrische Bestimmung der absoluten Zellzahl in Vollblut	69
4.9	HISTOLOGIE	69
4.9.1	Material	69
4.9.2	Gewinnung von Organen und Vorbereitung für die Histologie.....	71
4.9.3	Fluoreszenz von Eihäuten	71
4.9.4	Herstellung von Gewebeschnitten	71
4.9.5	Immunhistologische Färbung von Gefrierschnitten	71
5	ERGEBNISSE	74
5.1	CHARAKTERISIERUNG DES RETROVIRALEN GENTRANSFERSYSTEMS RCAS.....	74
5.1.1	Erstellung der Vektoren und Klonierung.....	74
5.1.2	Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein in Fibroblasten	77
5.1.2.1	Expression von eGFP und GFP.....	77
5.1.2.2	Expression von chBAFF-Flag und huBCMA-Fc	80
5.1.3	<i>In vivo</i> -Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein	81
5.1.3.1	Histologische Untersuchungen zur Virusexpression	81
5.1.3.2	Untersuchungen zur Expression von chBAFF-Flag im Plasma	87
5.1.4	Untersuchungen zur biologischen Aktivität des RCAS(BP)A-basierten Proteins.....	89
5.1.4.1	Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chBAFF-Flag-Expression	90
5.1.4.2	Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten huBCMA-Fc-Expression	97
5.1.5	Auswirkungen der RCAS(BP)A-Expression auf Leukozytenfrequenzen in Blut und verschiedenen Organen	104
5.2	<i>IN VIVO</i> -UNTERSUCHUNGEN ZUM CD40/CD40L-SYSTEM BEIM HAUSHUHN	109
5.2.1	Klonierung verschiedener chCD40 Konstrukte.....	110
5.2.1.1	Klonierung von chCD40 in pCR3.....	110
5.2.1.2	Klonierung von chCD40-huFc in RCAS(BP)A	111
5.2.2	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zur Funktionalität von chCD40-huFc	112
5.2.2.1	Nachweis von chCD40-huFc in Zellkulturüberstand	112
5.2.2.2	Nachweis der Bindung von chCD40-huFc an chCD40L-Fusionsprotein.....	113
5.2.3	<i>In vivo</i> -Untersuchungen an RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Hühnern.....	117
5.2.3.1	<i>In vivo</i> -Expression von chCD40-huFc	118

5.2.3.2	<i>In vivo</i> -Wirkung von RCAS(BP)A-basierter chCD40-huFc-Expression auf Blutleukozyten .	119
5.2.3.3	Auswirkungen auf das Organgewicht am Tag 74	123
5.2.3.4	Auswirkungen auf Leukozytenfrequenzen in lymphatischen Organen am Tag 74	124
5.2.3.5	Auswirkungen von RCAS(BP)A-basierter chCD40-huFc-Expression auf Plasmaimmunglobulinspiegel	127
5.2.3.6	Immunhistologische Untersuchungen	128
6	DISKUSSION	131
6.1	EINSATZ DER RCAS-GENTRANSFERTECHNOLOGIE FÜR FUNKTIONELL GENOMISCHE STUDIEN BEIM HUHN	131
6.2	ETABLIERUNG DER RCAS-GENTRANSFERTECHNOLOGIE.....	132
6.2.1	<i>In vitro</i> -Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein in HEF verschiedener Hühnerlinien.....	133
6.2.2	<i>In vivo</i> -Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein	135
6.2.2.1	Expression von Virusprotein in verschiedenen Hühnerlinien	135
6.2.2.2	Expression von Virusprotein in Gefäßen	137
6.2.2.3	Anhaltende Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein.....	138
6.2.3	Expression von biologisch aktivem chBAFF-Flag.....	139
6.2.4	Knockdown von endogenem chBAFF mit dem löslichen Rezeptor huBCMA-Fc.....	143
6.3	AUSWIRKUNGEN EINER INFEKTION MIT RCAS(BP)A	144
6.4	FUNKTIONELLE <i>IN VIVO</i> -STUDIEN AM CD40/CD40L-SYSTEM DES HAUSHUHNS	147
6.4.1	Auswirkung von chCD40-huFc auf B-Zell-Frequenzen	148
6.4.2	Auswirkungen von chCD40-huFc auf Immunglobulinspiegel.....	150
6.4.3	Mögliche weitere Schritte zur Charakterisierung des CD40/CD40L-Systems beim Haushuhn.....	151
6.5	ZUKÜNFTIGER EINSATZ DER RCAS-GENTRANSFERTECHNOLOGIE IN FUNKTIONELL- GENOMISCHEN STUDIEN BEIM HAUSHUHN.....	152
7	ZUSAMMENFASSUNG	156
8	SUMMARY	158
9	LITERATURVERZEICHNIS	160
10	ANHANG	182

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7AAD	7 Aminoactinomycin
AID	Aktivierungs-induzierte-Deaminase (<i>activation induced deaminase</i>)
Amp	Ampicillin
APRIL	<i>a proliferation inducing ligand</i>
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ASLV	Aviärer Sarkom/Leukose-Virus
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor der TNF-Familie
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BLyS	<i>B lymphocyte stimulator</i>
BP	Bryan Polymerase
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CAML	<i>calcium modulator and cyclophilin ligand</i>
CD40L	CD40-Ligand
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus
DAPI	4'6'Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNP-KLH	<i>Dinitrophenol Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
dNTPs	Desoxy-Nukleotid-Triphosphate
DR	<i>direct repeat</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EIAV	Equines infektiöses Anämievirus
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
esTMB	<i>enhanced soluble Tetramethylbenzidin</i>
EST	<i>expressed sequence tags</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	konstanter Teil des Immunglobulinmoleküls (<i>fragment crystalizable</i>)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GALT	Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>gut associated lymphoid tissue</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HA	Hämagglutinin
HEF	Hühnerembryofibroblasten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus 1
huFc	konstanter Teil des humanen Immunglobulinmoleküls (<i>human fragment crystalizable</i>)
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDL-Rezeptor	<i>low density lipoprotein receptor</i>
L-Kette	leichte Kette des Immunglobulinmoleküls

LSL	<i>Lohmann's selected leghorn</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minuten
MLV	Maus-Leukämie-Virus
mRNA	Messenger RNA
Neo	Neomycin
OD	Optische Dichte
p. v.	post vaccinantionem
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Pyrococcus furiosus
PMA	Phorbol Myristat Acetat
POD	Peroxidase
RAV	Rous-assoziiertes Virus
RCAN	<i>replication competent ASLV – LTR no splice acceptor</i>
RCAS	<i>replication competent ASLV – LTR with a splice acceptor</i>
RCON	<i>replication competent ASLV – RAV-O – LTR no splice acceptor</i>
RCOS	<i>replication competent ASLV – RAV-O – LTR with a splice acceptor</i>
RNA	Ribonucleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA Interferenz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Rous Sarkoma-Virus
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
rv	revers
SA	Splice-Akzeptor
SD	Splice-Donor
sec	Sekunden
shRNA	<i>short hairpin-RNA</i>
siRNA	<i>short interfering-RNA</i>
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SPF	spezifisch pathogenfrei
TACI	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>
TALL-1	<i>TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand 1</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS gepufferte Salzlösung (<i>TRIS buffered saline</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TE	TRIS-EDTA
THANK	<i>TNF homologue that activates apoptosis, NFκB and c-Jun NH2-terminal kinase</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFSF13b	<i>TNF-superfamily member 13b</i>
TRAP	<i>TNF related activation protein</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Prototyp des retroviralen Genoms	5
Abbildung 2: Genom des Rous Sarkoma-Virus.....	5
Abbildung 3: Retroviraler Lebenszyklus	7
Abbildung 4: Genom des RCAS-Vektors	9
Abbildung 5: Vergleich der B-Zell-Reifung bei Mensch/Maus und Huhn.....	26
Abbildung 6: BAFF und APRIL mit den zugehörigen Rezeptoren bei Mensch/Maus und Huhn	30
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aktivierung von B-Zellen	35
Abbildung 8: Arbeitsablauf zur Erstellung Transgen-exprimierender Hühner mit dem RCAS-System.....	58
Abbildung 9: ELISAs zum Nachweis von chCD40-huFc	62
Abbildung 10: Aufbau des chBAFF-Flag-ELISAs.....	63
Abbildung 11: Färbung von chCD40 auf HD11 Zellen.....	68
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Vektors RCAS(BP)A	75
Abbildung 13: Darstellung der zur Charakterisierung des RCAS-Systems verwendeten Konstrukte	75
Abbildung 14: Agarosegel nach dem Verdau von pEGFP-N1	76
Abbildung 15: Agarosegel nach erfolgter Bakterien-PCR.....	76
Abbildung 16: Orientierungskontrolle des ligierten Inserts.....	77
Abbildung 17: Fluoreszenz eGFP transfizierter/transduzierter HEF	78
Abbildung 18: FACS Analyse GFP-transfizierter Linie „0“ Fibroblasten	79
Abbildung 19: eGFP -Expression in HEF der Linien „0“, LSL A und LSL C.....	79
Abbildung 20: Nachweis der Expression von RCAS(BP)A-basiertem chBAFF-Flag und huBCMA-Fc im ELISA	81
Abbildung 21: Allantochorion RCAS(BP)A-eGFP-transduzierter Hühnerembryonen an den Embryonaltagen 10 und 14	84
Abbildung 22: Expression von viralem Protein p19 in verschiedenen Organen	85
Abbildung 23: Expression von viralem Protein am Embryonaltag 18 und Tag 63	86
Abbildung 24: chBAFF-Flag-Expression in Hühnern der Linie LSL	88
Abbildung 25: Verlauf der mittleren Expression von chBAFF-Flag in Hühnern der Linie LSL.....	88
Abbildung 26: chBAFF-Flag-Expression in Hühnern der Linie „0“	89
Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie einer Doppelfärbung von Blutleukozyten.....	92
Abbildung 28: Exemplarische B-Zell Färbung eines RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-	

transduzierten und eines RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten Tieres am Tag 26	93
Abbildung 29: Auswirkungen der RCAS-basierten chBAFF-Flag-Expression auf Milzleukozyten	94
Abbildung 30: Auswirkung der RCAS-basierten chBAFF-Flag-Expression auf das Milzgewicht	94
Abbildung 31: Auswirkungen von RCAS(BP)A-basiertem chBAFF-Flag auf Plasmaimmunglobulinspiegel.....	96
Abbildung 32: Spiegel von KLH-spezifischem Plasmaimmunglobulin.....	97
Abbildung 33: B-Zell-Färbung eines RCAS(BP)A-huBCMA-transduzierten und eines Kontrolltieres (exemplarisch)	99
Abbildung 34: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten huBCMA-Fc-Expression auf Milzleukozyten	100
Abbildung 35: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chBAFF-Flag-Expression, Histologie von Bursa fabricii und Milz	102
Abbildung 36: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten huBCMA-Fc-Expression, Histologie von Bursa fabricii und Milz	103
Abbildung 37: Absolute Quantifizierung von Leukozytenpopulationen RCAS(BP)A-transduzierter und unbehandelter Hühner am Tag 73	106
Abbildung 38: Auswirkungen des Vektors RCAS(BP)A auf Milzleukozyten.....	107
Abbildung 39: Auswirkungen des Vektors RCAS(BP)A auf Leukozyten des Knochenmarks	108
Abbildung 40: Auswirkungen von RCAS(BP)A auf Thymuszellen	108
Abbildung 41: Schema der Inhibition des CD40/CD40L-Systems	109
Abbildung 42: Klonierung von chCD40 in pCR3-huFc	110
Abbildung 43: Diagnostischer Verdau bei Klonierung von chCD40 in pCR3-huFc ..	111
Abbildung 44: Klonierung von chCD40-huFc in RCAS(BP)A.....	112
Abbildung 45: Nachweis von chCD40-huFc in Zellkulturüberständen.....	113
Abbildung 46: Bindung von chCD40-huFc an chCD40L im ELISA	114
Abbildung 47: Färbung von chCD40 auf der Oberfläche von HD11-Zellen.....	115
Abbildung 48: Inhibition der Bindung von chCD40L-Fusionsprotein an membranständiges chCD40 von HD11-Zellen.....	115
Abbildung 49: Inhibition der chCD40L vermittelten Proliferation von B-Zellen	116
Abbildung 50: Expression des chCD40-huFc Proteins <i>in vivo</i>	118
Abbildung 51: Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie in der Dreifachfärbung von Blutleukozyten.....	120
Abbildung 52: Verlauf der Frequenzen AV20-positiver B-Zellen von RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierten Tieren	122
Abbildung 53: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von AV79 auf B-Zellen	

RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierter Tiere..	122
Abbildung 54: Absolute Quantifizierung von Leukozytenpopulationen RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierter Tiere am Tag 73.....	123
Abbildung 55: Auswirkungen von RCAS(BP)A-chCD40-huFc auf Organgewichte	124
Abbildung 56: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten Expression von chCD40-huFc auf Milzleukozyten	125
Abbildung 57: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chCD40-huFc-Expression auf Leukozytenfrequenzen im Knochenmark.....	126
Abbildung 58: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten Expression von chCD40-huFc auf Thymuszellen	126
Abbildung 59: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chCD40-huFc-Expression auf die Gesamtimoglobulinspiegel im Plasma	127
Abbildung 60: Immunhistochemische Färbung der Bursa fabricii RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierten Tieren am Tag 74 (Bildtafel 1)	129
Abbildung 61: Immunhistochemische Färbung von der Bursa fabricii RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierten Tieren am Tag 74 (Bildtafel 2)	130
Abbildung 62: Schema für die Durchführung funktionell-genomischer Studien beim Haushuhn	155

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammenfassung der wichtigsten Vektoren des RCAS-Gentransfersystems	11
Tabelle 2: Ausgewählte Anwendungsbeispiele des RCAS-Systems	15
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien.....	42
Tabelle 4: Verwendete Konstrukte.....	44
Tabelle 5: In der Klonierung verwendete Primer.....	47
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die PCR.....	48
Tabelle 7: Primer zur Erfolgskontrolle der Ligation.....	53
Tabelle 8: Im ELISA verwendete Antikörper.....	60
Tabelle 9: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Primärantikörper	66
Tabelle 10: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Sekundärantikörper	66
Tabelle 11: In der Immunhistologie eingesetzte Primärantikörper.....	70
Tabelle 12: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chBAFF-Flag-Expression auf Lymphozytenfrequenzen im Blut	92
Tabelle 13: Auswirkungen der RCAS-basierten huBCMA-Fc-Expression auf Lymphozytenfrequenzen im Blut	99
Tabelle 14: Leukozytenfrequenzen im Blut von RCAS-transduzierten und untransduzierten Hühnern der Linie LSL.....	105
Tabelle 15: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten Expression von chCD40hu-Fc auf Lymphozytenfrequenzen im Blut	121

1 Einleitung

Das Huhn stellt ein wichtiges Modelltier für zahlreiche Gebiete der Grundlagenforschung, insbesondere für die Infektionsmedizin, die Immunologie, die Embryologie, die vergleichende Genomforschung und wie auch die Tierzucht dar. Darüberhinaus ist diese Spezies jedoch auch wirtschaftlich von außerordentlicher Bedeutung. Es gilt in vielen Regionen der Welt als wichtigste Proteinquelle für den Menschen und wird im Hinblick auf die Zunahme der Weltbevölkerung noch an Bedeutung gewinnen.

Da medikamentöse Interventionen beim Huhn als lebensmittellieferndes Tier nur sehr eingeschränkt in Frage kommen, wird vornehmlich durch Resistenzzucht und Vakzinierung Einfluss auf den Gesundheitsstatus der Tiere genommen. Sowohl für die Züchtung resistenter Hühnerlinien als auch für die Entwicklung potenter Vaccinen ist eine umfassende Kenntnis der Vorgänge im Immunsystem der Tiere essentiell, zumal sich dieses erheblich von dem der Säuger unterscheidet.

Weitreichende neue Möglichkeiten ergaben sich mit der Sequenzierung des Hühnergenoms, welches als erstes Haustiergenom im Jahr 2004 vollständig sequenziert wurde [1]. Diese Informationen ermöglichen nun unter Einsatz von Transkriptom- und Proteomanalysen die rasche und gezielte Identifizierung von Kandidatengenen, die eine Rolle in der Regulation von Mechanismen des Immunsystems spielen.

Die Relevanz identifizierter potentieller Kandidaten kann jedoch nur durch eine detaillierte funktionale Analyse geklärt werden.

Nach Klonierung eines Kandidatengens können *in vitro*-Versuche mit rekombinant hergestellten Proteinen erste wertvolle Hinweise für die Funktion des Gens liefern. Für die vollständige Klärung muss jedoch in letzter Konsequenz die Überprüfung ihrer Wirkung im lebenden Organismus erfolgen. Im Mausmodell erfolgt dieser Schritt mittels Erstellung transgener bzw. knockout-Linien. Hierbei soll am transgenen Tier ein Funktionsgewinn (*gain of function*) untersucht werden, ein knockout soll Aufschluss über Auswirkungen eines Funktionsverlustes (*loss of function*) vermitteln.

Die Generierung Keimbahn-transgener Hühner ist zwar bereits mehrfach gelungen [2, 3], deren Erstellung ist jedoch noch immer relativ ineffizient und überaus langwierig. Eine Alternative hierfür stellt der somatische Gentransfer mittels viraler Vektoren dar. Im ersten Teil dieser Arbeit ist die Etablierung und Charakterisierung des retroviralen Gentransfersystems RCAS beschrieben. Im zweiten Teil wurden mit Hilfe des nun etablierten Systems Untersuchungen an einem ersten Kandidatengenpaar, dem CD40/CD40L-System des Haushuhns, durchgeführt.

2 Literaturübersicht

2.1 Funktionell-genomische Studien beim Haushuhn

Nachdem das Genom des Huhnes als eines der ersten Haustiergenome sequenziert wurde, stellt die funktionale Genomanalyse nun den nächsten Schritt zur Erforschung der Funktion und der Regulation einzelner Gene dar [4]. Auf Transkriptomebene lieferten Arrayexperimente zahlreiche für das Hühnerimmunsystem potentiell bedeutsame Kandidatengene [5-8]. Eine weitere Spezifizierung der Kandidaten stellen proteomische Untersuchungen dar [9]. Hier wurden Studien an immunrelevanten Organen wie der Bursa fabricii [10] oder der Harder'schen Drüse [11] durchgeführt. Bei der weiteren Analyse können *in vitro*-Versuche wertvolle Anhaltspunkte zur Funktion einzelner Gene geben. Die genaue Funktion eines Gens kann jedoch nur in der Gesamtheit des lebenden Organismus untersucht werden.

In einigen früheren Studien zur Funktion von Hühnerzytokinen wurde das Protein von Interesse im Sinne des Prinzips des Funktionsgewinns (*gain of function*) nach Klonierung und rekombinanter Herstellung den Tieren injiziert [12-14]. Diese *in vivo*-Versuche sind jedoch auf die ersten Lebenstage der Tiere begrenzt, da die Herstellung rekombinanten Proteins aufwändig und teuer ist. Technologien zum Gentransfer sowie zur Erstellung transgener Hühner, welche eine weiterreichende Erforschung des Immunsystems auch von adulten Tieren ermöglichen würden, sind zwar grundsätzlich verfügbar, jedoch immer noch langwierig und ineffektiv.

Grundsätzlich muss zwischen somatischem und Keimbahn-Gentransfer unterschieden werden. Beim Keimbahn-Transfer wird ein Transgen in Keimzellen eines Organismus eingeschleust. Damit wird das Transgen an Tiere der nachfolgenden Generation weitervererbt, welche zur Erstellung transgener Zuchtlinien verwendet werden können. Im Gegensatz dazu wird bei somatischem Gentransfer ein Transgen in Körperzellen eines Organismus übertragen, jedoch gelangt dieses nicht in die Keimbahn. Eine Erstellung transgener Tierlinien ist somit nicht möglich [15].

2.1.1 Das retrovirale Vektorsystem RCAS

In dieser Arbeit soll das retrovirale Vektorsystem RCAS als Werkzeug für somatischen Gentransfer in funktionell-genomischen Studien beim Haushuhn etabliert und bewertet werden.

2.1.1.1 Kurze Einführung in die Biologie der Retroviren

Die ersten Retroviren wurden vor ca. 100 Jahren entdeckt. Annähernd zeitgleich entdeckten die dänische Arbeitsgruppe von Vilhelm Ellerman und Oluf Bang [16] sowie der amerikanische Wissenschaftler Peyton Rous [17], dass bestimmte Tumoren des Huhns durch ein zellfreies Agens übertragen werden können. Das von Rous entdeckte Virus rief Spindelzellsarkome hervor [18] und wurde nach ihm Rous Sarkoma-Virus benannt. Für seine Entdeckung erhielt er im Jahr 1966 den Nobelpreis für Medizin [19]. Genauere Aspekte der Übertragung wie Informationen über das RNA-Genom [20], die reverse Transkription [21, 22] und den Einbau von Provirus in die Wirts-DNA [23] wurden jedoch erst ca. 50 Jahre später beschrieben.

Die Familie der Retroviridae ist in mehrere Gruppen aufgeteilt [24, 25], denen die Organisation des RNA-Genoms gemeinsam ist (siehe Abbildung 1). Das in die Wirts-DNA integrierte Provirus enthält die Gene *gag*, *pol* und *env*. *Gag* (group specific antigen) codiert für das initiale Strukturprotein des Viruspartikels, welches durch Modifikationen vielfältige Aufgaben erfüllen kann. *Pol* steht für Polymerase und codiert für virale Enzyme, wobei die virale Protease in einigen Typen von Retroviren auf anderen Genen codiert ist [24]. Das Gen *env* (envelope) codiert für die Proteine der Hülle. Die namensgebende Besonderheit der Retroviren, ist die Umschreibung des einsträngigen RNA-Genoms mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA und der Einbau dieser in das Genom des Wirtsorganismus [25].

Das Genom des Provirus wird beiderseits von sog. *long terminal repeats* (LTR) flankiert. Diese Regionen werden in drei Elemente unterteilt: *U3*, *R* und *U5*, welche während des Prozesses der reversen Transkription entstehen. Die Funktion der LTRs besteht in der Regulation der Transkription mittels Promotor- und Enhancer-Elementen [24].



Abbildung 1: Prototyp des retroviralen Genoms

Das retrovirale Genom umfasst die Gene *gag*, *pol* und *env*.

Gag codiert für virale Strukturproteine. *Pol* ist das Gen für die viralen Enzyme. Das Gen *env* codiert für Proteine der Virushülle. Flankiert werden diese Gene beidseits von repetitiven Gensequenzen, sog. *long terminal repeats* (LTR).

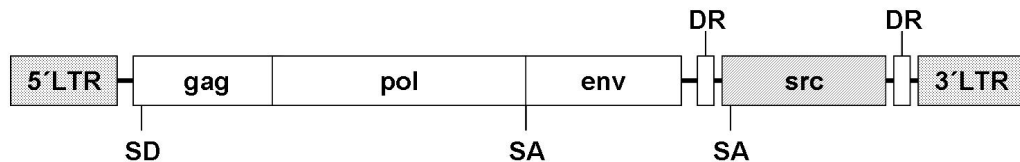


Abbildung 2: Genom des Rous Sarkoma-Virus

Die viralen Gene sind 5' und 3' von *long terminal repeats* (LTR) flankiert, welche wichtige Funktionen bei der viralen Transkription übernehmen. Die Gene *env* und *src* werden durch Splicing transkribiert, hierfür notwendig sind eine Sequenz, die als Splice-Donor agiert (SD) und jeweils eine als Splice-Akzeptor (SA) wirkende Sequenz. Das Gen *src* ist von repetitiven Sequenzen, sog. *direct repeats* (DR) umrahmt.

Das RCAS-Genfersystem basiert auf dem Rous Sarkoma-Virus (RSV). Dieses Retrovirus gehört zur Gruppe der aviären Typ C Retroviren, auch aviäre Sarkom/Leukose-Viren (ASLV) genannt [24]. Das RSV enthält im Gegensatz zu vielen anderen Retroviren dieser Gruppe, ein vollständiges retrovirales Genom mit den Genen *gag*, *pol* und *env* (siehe Abbildung 2) und ist damit replikationskompetent. Im Jahr 1963 wurde jedoch mit dem *Bryan* Hochtiter Stamm des RSV (RSV (*Bryan*)) ein replikationsdefizientes Retrovirus beschrieben [25, 26]. Da in diesem das Gen *env* fehlt, benötigt es zur Komplettierung der Viruspartikel ein Helfervirus, welches das fehlende Gen trägt. In den darauffolgenden Jahren machten Vogt und Weiss die Beobachtung, dass es in bestimmten Zellen auch ohne ein Helfervirus möglich war, infektiöse Partikel des RSV (*Bryan*) zu erhalten [27, 28]. Dieselbe Beobachtung machten Hanafusa et al. und schlossen daraus, dass hier ein zellgebundener Faktor involviert sein

musste [29]. Dies wurde durch den Nachweis von viralen DNA-Sequenzen im Hühnergenom bestätigt [30-32] und führte zur erstmaligen Annahme, dass Retroviren endogen im Hühnergenom vorkommen und auch weitervererbt werden [32]. Replikationskompetentes RSV hat zusätzlich zu den essentiellen Genen *gag*, *pol* und *env* das Gen *src*, welches für die Entstehung der für die Infektion typischen Tumoren verantwortlich ist. Dies ist eine Besonderheit, da Onkogen tragende (sog. akut transformierende ASLV) in der Regel replikationsdefizient sind. Sie weisen einen Defekt in einem der essentiellen retroviralen Gene auf [18, 33]. Das *src* Onkogen codiert für eine Tyrosinkinase, die die ungehemmte Proliferation der Wirtszelle fördert und somit eine entscheidende Rolle bei der Transformation der Wirtszelle spielt [34, 35]. Bei Transkription des Provirus entstehen zum einen ungespligte RNA-Stränge, welche im Kern als mRNA zur Translation der von *gag* und *pol* kodierten Proteine sowie als Genom in Viruspartikel verpackt werden. Zum anderen entsteht auch RNA, aus welcher durch Splicing die mRNA für *env* und *src* entsteht [33, 36]. Nach dem Zusammenfügen des Nukleokapsids erhält das Virus beim Verlassen der Wirtszelle seine Lipidhülle. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, erfolgt die Aufnahme des behüllten Retrovirus in die Zelle rezeptorvermittelt. Hierbei bindet das Virus mittels eines Hüllglykoproteins an einen Rezeptor der Wirtszelle, was zur Verschmelzung der viralen Lipidhülle mit der Zellmembran führt.

In der Gruppe der ASLV unterscheidet man sechs verschiedene Untergruppen an Hüllproteinen (A bis E, J) [34, 37]. Die zugehörigen zellmembranständigen Rezeptormoleküle werden auf drei autosomalen Loci (*tv-a*, *tv-b* und *tv-c*) kodiert. Hierbei ist *tv-a* Rezeptor für Hüllproteine der Gruppe A, *tv-b* für die Hüllproteine B, D und E und *tv-c* Rezeptor für Proteine der Gruppe C [34, 38]. Über die physiologischen Funktionen dieser Moleküle im Organismus des Wirtstieres ist wenig bekannt. Das von *tv-a* kodierte Membranprotein beispielsweise ähnelt LDL-Rezeptoren [24, 39]. Abweichungen in der Aminosäuresequenz können bewirken, dass eine eventuelle physiologische Funktion des Proteins erhalten bleibt, jedoch keine Bindung an retrovirales Hüllprotein mehr möglich ist [24]. Dies erklärt auch das Vorliegen von Resistenzen in einigen Hühnerlinien gegenüber verschiedenen ASLV [40]. Eine weitere Beobachtung war, dass Tiere gegenüber Infektionen desselben Subtyps resistent waren, wenn sie zuvor

experimentell mit einem aviären Sarkom/Leukose-Virus infiziert wurden [41, 42]. Dieser Mechanismus wird Rezeptor-Interferenz genannt. Es wurde vorgeschlagen, dass beim Prozess der Fusion des Viruspartikels mit der Zellmembran ein inhibitorisches Peptid entsteht, welches ein erneutes Binden eines viralen Partikels verhindert [43, 44].

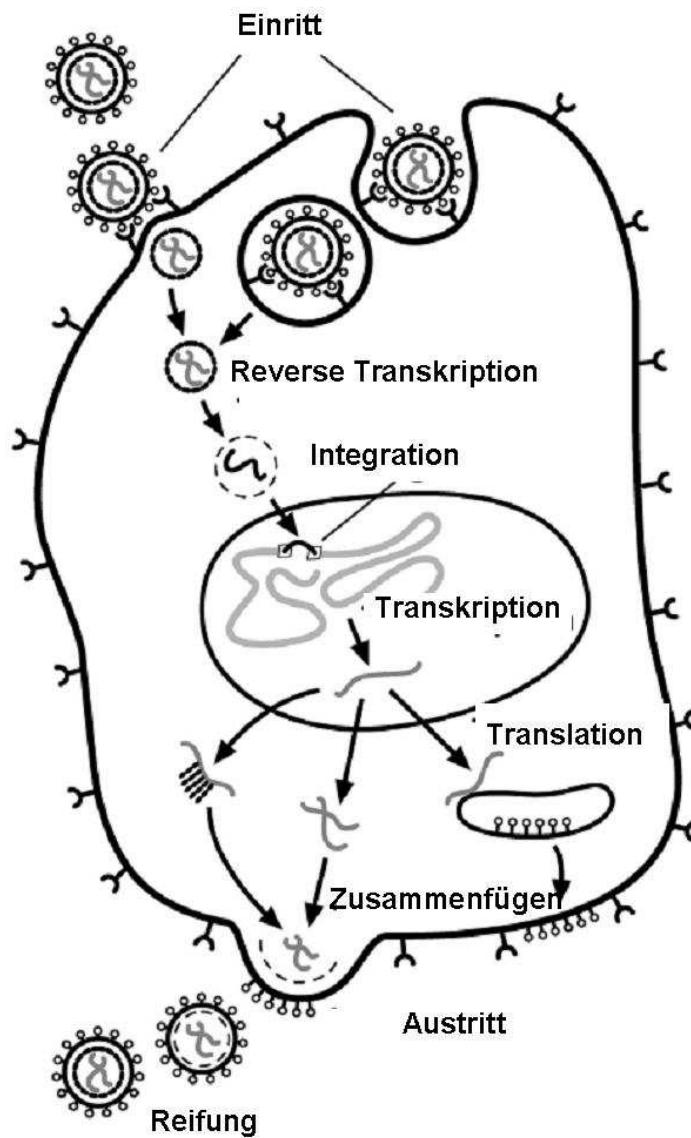


Abbildung 3: Retroviraler Lebenszyklus
Modifiziert übernommen aus Hughes, 2004 [38].

2.1.1.2 Entwicklung des RCAS-Vektorsystems

Das retrovirale Gentransfersystem RCAS wurde Mitte der 1980er Jahre im Labor des Retrovirologen Stephen Hughes entwickelt [38]. Es basiert auf dem replikationskompetenten Schmidt-Ruppin-Stamm des Rous Sarkoma-Virus (siehe 2.1.2). Teilsequenzen dieses Virus waren bereits von Czernilofsky et al. veröffentlicht [45-47]. Untersuchungen, in denen das *src* Onkogen mit Restriktionsenzymen aus dem Virus herausgeschnitten und stattdessen eine *ClaI* Schnittstelle eingefügt worden war, hatten gezeigt, dass das *src* Onkogen vom Virus nicht zur Replikation benötigt wird. Jedoch stellte sich eine 9 bis 29 bp umfassende Sequenz, welche 5' an die U3-Region der 3' LTR angrenzt [48] als essentiell für die Virusvermehrung heraus. In weiteren Studien wurde herausgefunden, dass zwei relativ homologe 115 bp Sequenzen sich wiederholender Nukleotide (*direct repeats*) beidseits des *src* Onkogens eine wichtige Rolle bei der Verpackung von transkribierter Virus-RNA spielen [49]. Da diese Sequenzen jedoch während der reversen Transkription häufig der Rekombination unterworfen sind, wäre der Verlust eines an Stelle von *env* eingefügten Transgens relativ wahrscheinlich gewesen. Daher veränderte die Gruppe um Stephen Hughes das Virus so, dass eine Rekombination an dieser Stelle verhindert wird [50]. Das 5' *direct repeat* wurde hierzu entfernt. Da hierbei auch der für die Expression des Gens *env* benötigte Splice-Akzeptor verloren ging, wurde eine Sequenz, welche diese Aufgabe erfüllt, zusätzlich eingefügt. Auch in diesem Konstrukt war an der Stelle von *src* eine *ClaI* Schnittstelle eingefügt, die zur Insertion von Transgenen dienen sollte. Diese Schnittstelle wurde gewählt, weil das Enzym den Vektor nur einmal schneidet. Eine zweite vorhandene *ClaI* Schnittstelle in der 5' LTR unterliegt der Methylierung und kann somit bei in *E. coli* vermehrtem Plasmid nicht geschnitten werden [49]. Wie auch in anderen retroviralen Systemen ist die Größe des Inserts im Vektor limitiert [24, 51]. Die maximale Größe von Inserts im RCAS-System liegt bei einer Länge von ca. 2,5 kb [38, 52-54]. In weiteren Arbeiten wurde die Effizienz des Vektors durch Mutagenese weiter verbessert [55]. Außerdem wurde die virale Vektorsequenz in ein Derivat des bakteriellen Plasmid pBR322 mit defekter *ClaI* Schnittstelle inseriert [54]. Dies sollte einerseits die Effizienz einer initialen

Transfektion von aviären Zellen verbessern und so einen schnelleren Start der Virusinfektion gewährleisten. Andererseits war nun auch durch die im Plasmid codierte Ampicillinresistenz eine einfache Vermehrung des Vektors möglich. Zusätzlich zum bisherigen Vektor, welcher ein Gen *env* der Untergruppe A enthielt, wurde nun auch eine Variante mit einem Hüllprotein der Gruppe B entwickelt. Dies ermöglichte eine Infektion von Zellen mit dem Rezeptor *tv-b* bzw. Doppelinfektionen von Zellen mit beiden Rezeptoren. In späteren Arbeiten von Fekete et al. wurden darüber hinaus Vektoren der Subtypen D und E erstellt [56]. Um die Anwendung des Systems zu erleichtern, entwickelten Hughes et al. eine Reihe von Adaptorplasmiden, welche neben der zur Klonierung in den Vektor benötigten *ClaI* Schnittstelle auch zahlreiche andere Enzymschnittstellen enthalten [54].

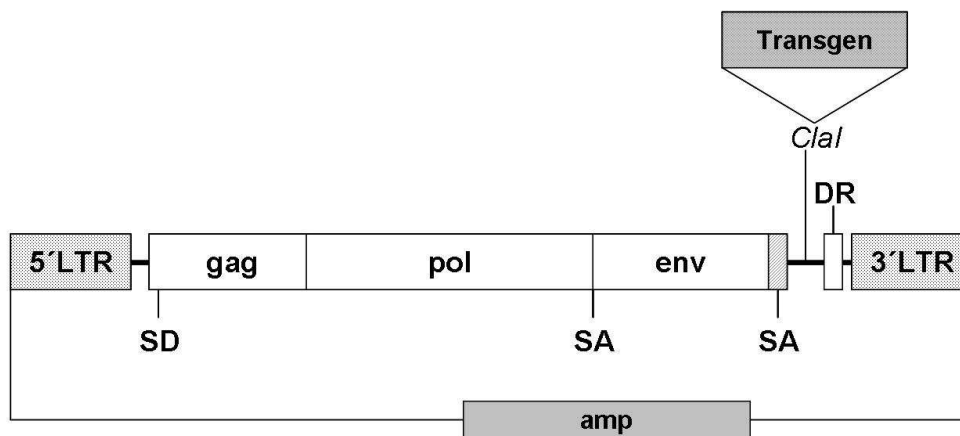


Abbildung 4: Genom des RCAS-Vektors

Das Gen *src* des RSV wurde durch eine *ClaI* Schnittstelle ersetzt, in welche Transgene bis zu einer Größe von 2,5 kb eingefügt werden können. Da das Gen *src* keine essentiellen Funktionen bei der Virusvermehrung übernimmt, ist der resultierende Vektor replikationskompetent. Das virale Genom wurde zur effizienteren initialen Transfektion von Zellen in ein Plasmid mit Ampicillin-Resistenz (*amp*) eingefügt.

Nach den oben beschriebenen Entwicklungen wurde der Vektor nun RCAS (replication competent ASLV – LTR with a splice acceptor) genannt. Dieser erfuhr im Lauf der Zeit einige Modifikationen. Zusammen mit RCAS wurde ein weiterer Vektor entwickelt, in welchem der für die Expression des inserierten Transgens essentielle Splice-Akzeptor 3' des Gens *env* fehlt. Dieses mit RCAN (replication competent ASLV – LTR no splice acceptor) bezeichnete Konstrukt, ermöglicht die Transkription des Transgens von dem in der LTR Sequenz

liegenden Promotor des Vektors zu entkoppeln. Statt dessen besteht die Möglichkeit, die Transkription unter die Kontrolle eines endogenen, zusammen mit dem Transgen inserierten Promotors zu stellen [38]. Dies ermöglicht beispielsweise die Verwendung gewebsspezifischer Promotoren [57, 58] oder induzierbarer Promotoren [59]. Eine zweite Anwendungsmöglichkeit stellt die Verwendung als Kontrollvektor ohne Transgenexpression dar.

In einem weiteren Schritt ersetzten Greenhouse et al. die aus dem RSV stammenden LTRs des Vektors durch LTRs eines endogenen aviären Leukose Virus, des Rous-assoziierten Virus (RAV), Typ O [53]. Da in diesen Sequenzen bestimmte Enhancer Elemente fehlen, kann damit eine moderatere Genexpression erreicht werden. Dieses Konstrukt erhielt den Namen RCOS (replication competent ASLV – RAV-O – LTR with a splice aceptor). Analog zu RCAS und RCAN wurde auch ein Vektor ohne 3'Splice-Akzeptor konstruiert und mit RCON (replication competent ASLV – RAV-O – LTR no splice aceptor) benannt. Diese Vektoren wurden vor allem im Hinblick auf einen Einsatz zur Generierung transgener Tiere entwickelt. Im Vergleich zu RCAS ist die Transgenexpression in RCAN niedriger. Sowohl mit RCAS als auch mit RCOS war es möglich, das Transgen in Hühnerembryofibroblasten (HEF) zu transferieren und in diesen zu exprimieren [53, 54]. Um die Transgenexpression zu erhöhen, wurde das Gen *pol* der Vektoren durch jenes aus dem Hochtiter Stamm RSV (*Bryan*) ersetzt [35, 52]. Die hieraus resultierenden Vektoren erhielten den Zusatz BP (Bryan Polymerase). Eine Zusammenfassung der wichtigsten Vektoren des RCAS-Systems findet sich in Tabelle 1.

Vektor	Subtypen	LTR	Anwendung	Anmerkung
RCAS(BP)	A, B, D, E	ALV (enh+)	Sehr hohe Expression via LTR	Replikationskompetent, Bryan Polymerase
RCAS	A, B, D, E	ALV (enh+)	Hohe Expression via LTR	Replikationskompetent
RCAN(BP)	A, B, D	ALV (enh+)	Expression über internen Promotor	Replikationskompetent, Bryan Polymerase
RCAN	A, B, D	ALV (enh+)	Expression über internen Promotor	Replikationskompetent
RCOS(BP)	A, B, D	RAV-O (enh-)	Moderate Expression via LTR	Replikationskompetent, Bryan Polymerase
RCOS	A, B, D	RAV-O (enh-)	Niedrige Expression via LTR	Replikationskompetent
RCON(BP)	A, B, D	RAV-O (enh-)	Moderate Expression über internen Promotor	Replikationskompetent, Bryan Polymerase
RCON	A, B, D	RAV-O (enh-)	Niedrige Expression über internen Promotor	Replikationskompetent

Tabelle 1: Zusammenfassung der wichtigsten Vektoren des RCAS-Genfersystems

Eine weitere Innovation bedeutete eine von Loftus et al. durchgeführte Modifikation des RCAS(BP) Vektors zum Einsatz in einer sog. Gateway-Klonierung [60]. Diese hocheffiziente Klonierungstechnologie basiert auf der sequenzspezifischen Rekombination des Phagen λ , welcher die Fähigkeit besitzt, innerhalb bestimmter repetitiver Sequenzen enzymvermittelt in das Genom von *E. coli* zu integrieren [61, 62]. Loftus et al. fügten die hierfür benötigten Sequenzen in den Vektor ein und entwickelten zusätzlich Konstrukte zur Klonierung der Sequenz eines Hämagglutinin-Tags am 3' bzw. 5' Ende des Inserts [60].

2.1.1.3 Einsatz des RCAS-Systems

Mit der Erstellung von RCAS war es gelungen, ein effizientes System zu entwickeln, welches für eine Vielzahl von Fragestellungen anwendbar ist. RCAS ermöglicht einen effizienten Transfer von Genen in Hühnerzellen. Hierbei wird der Vorteil der Replikationskompetenz augenfällig, da sich teilende, Retrovirus freie HEF [63] oder Fibroblasten der Linie DF1 [64] nach der Transfektion infektiöse Viruspartikel bilden und so innerhalb von wenigen Tagen die gesamte Kultur infiziert wird [65, 66]. In späteren Publikationen wurde auch von einer Infektion nicht replizierender Zellen berichtet [67, 68]. Um den Erfolg der Infektion zu überprüfen, können Antikörper gegen das *gag-Protein* p19 eingesetzt werden [69].

Einsatz in Zellbiologie und Virologie

Das RCAS-System wurde zunächst für Untersuchungen der Funktion bestimmter Gene eingesetzt. In anfänglichen Studien wurde dabei die Wirkung von aviären Onkogenen wie z. B. dem aviären zellulären oder retroviralen Onkogen *jun* untersucht [70-72]. Auch wurde die Funktion speziesfremder Gene in Hühnerfibroblasten studiert. So untersuchten Givol et al. die Funktion des humanen *bcl-2* Gens, das antiapoptotische Wirkung besitzt [73]. Hierzu wurden HEF mit einem Konstrukt aus RCAS(BP) und humanem *bcl-2* transduziert. Die Lokalisation des RCAS-basierten Proteins in der Zelle konnte mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Auch konnte festgestellt werden, dass transduzierte Zellen gegenüber Apoptoseinduktion geschützt waren.

Garber et al. publizierten im Jahr 1991 erstmals, dass mit dem murinem *Mx-Gen* transduzierte HEF vor Influenzavirusinfektionen geschützt sind [74]. Auch hier wurde zur Transfektion ein RCAS(BP)-basiertes Konstrukt verwendet. Gerade im Hinblick auf die aktuelle Influenza Problematik gewinnen diese Ergebnisse an neuer Bedeutung [75].

Einsatz für embryologische Fragestellungen

Das RCAS-System ermöglicht auch Untersuchungen zur Wirkung ontogenetisch relevanter Gene. Von Fekete et al. wurde ein Protokoll zur Generierung von Embryochimären entwickelt, deren Zellen unterschiedliche Empfänglichkeiten für die verschiedenen Hüllproteine des RSV aufwiesen [56]. Hierfür wurde neben RCAS(BP)A auch der von der Gruppe eigens klonierte Vektor RCAS(BP)E eingesetzt. Als Transgen wurde die humane plazentäre Alkalische Phosphatase gewählt, da deren Produkt immunhistochemisch detektierbar ist [76]. *In vitro* wie auch *in ovo* Versuche zeigten, dass alle Zellen, welche sich mit einem Antikörper gegen Virusprotein p19 [69] anfärben ließen, auch positiv für die Färbung gegen die Alkalische Phosphatase waren [77]. Das heißt, dass alle transduzierten Zellen auch das Transgen bildeten. Zudem konnten keine Expressionsunterschiede zwischen beiden eingesetzten Vektoren festgestellt werden. Die Gruppe um Fekete legte ein besonderes Augenmerk auf die Transgenexpression in der Embryonalentwicklung des Zentralen Nervensystems. Hierbei konnte sie einen Einfluss von Zeitpunkt und Lokalisation der Virusinjektion auf die

Transgenexpression feststellen [77]. Wurde das Virus in die Otocyste injiziert, eine Struktur aus welcher im Verlauf der Embryonalentwicklung Innenohr und N. vestibulocochlearis entstehen, war die Transgenexpression weitestgehend auf diese Strukturen beschränkt. Außerdem wurden die Auswirkungen von Virusinjektion ins Neuralrohr in verschiedenen Embryonalstadien (nach Hamburger und Hamilton [78]) getestet. Eine Injektion in Embryonen vor dem Entwicklungsstadium VII resultierte in einer Embryonalsterblichkeit von 100%. Als mögliche Ursache konnte jedoch die Manipulation an sich nicht ausgeschlossen werden. Injektionen vor dem Stadium XI erwiesen sich am effektivsten, um eine Transgenexpression im Neuralrohr und entlang der ventralen Mittellinie zu erhalten. Im Gegensatz dazu erzielten Injektionen in den Stadien XIV-XVI dort keine Transgenexpression, jedoch in weiten Teilen des Gehirns.

In Versuchen von Riddle, Johnson et al. wurde die Wirkung des Gens *sonic hedgehog* näher untersucht. Dessen Homolog ist bei *Drosophila melanogaster* in der Entwicklung für eine korrekte Segmentierung und Flügelausbildung verantwortlich [79]. Mit Hilfe des von Fekete et al. entwickelten Vektors RCAS(BP)E wurden Zellen mit *sonic hedgehog* transduziert, welche dann in die Gliedmaßenanlage eines für diesen Subtyp resistenten Embryo transplantiert wurden [80]. Damit wurde das Transgen in den transplantierten Zellen exprimiert, jedoch war eine Infektion des restlichen Embryos nicht möglich. Hierbei konnte die wichtige Rolle des Gens für die anterior-posterior Ausbildung der Gliedmaßen entdeckt werden. Mit Hilfe der RCAS-Technologie konnte zudem festgestellt werden, dass *sonic hedgehog* auch bei der Determinierung der Dorsoventralachse des frühen Hühnerembryos wichtig ist.

Untersuchungen an geschlüpften Küken

Ratcliffe et al. wandten das RCAS-System erstmals an, um Untersuchungen an Bursa fabricii geschlüpfter Küken durchzuführen. Im Mittelpunkt des Interesses stand die Besiedelung der Bursa fabricii mit B-Zell-Vorläufern, welche ab dem 9. Tag der Embryonalentwicklung einsetzt. Es konnte gezeigt werden, dass zur B-Zell-Besiedelung kein funktionelles IgM auf der B-Zellmembran vorhanden sein muss [81]. Mittels RCAS-vermittelten Gentransfers wurde eine trunkierte Form des IgM-Rezeptors ($T\mu$) in B-Zellen exprimiert, in welchem der komplette

variable Teil sowie eine Domäne des konstanten Teils fehlten. Eine Antigenbindung konnte somit nicht stattfinden. Nach dem Schlupf konnten in der Bursa fabricii T μ -positive B-Zellen in großer Zahl nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass diese Zellen die Bursa nicht nur besiedeln können, sondern während der dort stattfindenden Reifung auch genauso proliferierten wie Zellen mit funktionellem IgM-Rezeptor. Phänotypisch konnte kein Unterschied zu Wildtyp B-Zellen festgestellt werden. In weiteren Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass T μ -exprimierende B-Zellen während der bursalen Reifungsphase bis zum Schlupf auch dem Mechanismus der Genkonversion unterlagen, welcher der Generierung eines variablen B-Zell-Rezeptorrepertoires dient [82]. Nach dem Schlupf unterlagen B-Zellen, welche T μ auf der Oberfläche trugen, jedoch selektiv der Apoptose [83]. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nicht das trunkierte IgM-Molekül die normale B-Zell-Entwicklung ermöglichte, sondern der zytoplasmatische Teil des mit dem B-Zell-Rezeptoren assoziierten Korezeptor Ig α dafür verantwortlich war. Hierfür wurden mittels RCAS(BP)-Fusionsproteine exprimiert, die entweder extrazellulären und transmembranen Anteil von CD8 α und die zytoplasmatische Domäne des Korezeptors Ig β umfassten oder aus extrazellulärem und transmembranen Teil von CD8 β und zytoplasmatischen Teil von Ig α bestanden. Es zeigte sich, dass Zellen, welche kein IgM auf der Oberfläche trugen, jedoch das CD8 β :Ig α -Molekül exprimierten, die Fähigkeit zur Besiedelung der Bursa fabricii besaßen [84]. Nach dem Schlupf gingen diese jedoch in Apoptose [85]. Dies legt die Vermutung eines antigenabhängigen Mechanismus bei der Selektion nach dem Schlupf nahe.

RNA Interferenz Experimente

In den letzten Jahren wurde das RCAS-System zunehmend für RNA Interferenz (RNAi) Studien genutzt. Gegenüber der in früheren Arbeiten am Hühnermodell eingesetzten Methode der Elektroporation von siRNAs hat der Einsatz des RCAS-Systems den Vorteil, dass die gewünschte siRNA von den transduzierten Zellen anhaltend produziert wird [86]. Erstmals publizierten Bromberg-White et al. den Einsatz eines RCAN(BP)A-Vektors, in welchem die Sequenz für eine short hairpin-RNA gegen das Transkript der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) unter der Kontrolle eines RNA Polymerase III

spezifischen Promotors (H1) kloniert worden war [87]. Hierfür war eine humane Zelllinie transient mit dem Rezeptor *tv-a* transfiziert worden und war somit für eine Infektion mit RCAN(BP)-H1-GAPDH empfänglich. Infizierte Zellen zeigten eine drastische Reduktion von GAPDH mRNA. Gegenüber anderen retroviralen Vektoren erzielte der hier eingesetzte eine ca. hundertfach höhere Effizienz [87, 88]. Harpavat und Cepko entwickelten einen RCAS-Vektor zum Einsatz von RNAi in der Retina von Hühnerembryonen *in vitro* und *in vivo* [86]. Zur Etablierung des Systems wählten sie als Ziel das für Visinin codierende Gen, weil für dieses retinale Protein eine Reihe von Antikörpern verfügbar ist. Die Ergebnisse zeigten eine selektive Infektion der Retina und einen daraus resultierenden knockdown von Visinin.

Vektor	Transgen	Spezies	Anwendung	Referenz
RCAS	jun	Wachtel, Fibroblasten	Wirkung des Onkogens jun in Fibroblasten	[70, 71]
RCAS	jun	Huhn, Fibroblasten	Wirkung des Onkogens jun in Fibroblasten	[72]
RCAS(BP)A RCAS(BP)B	humanes bcl-2	Huhn, Fibroblasten	Antiapoptotische Wirkung des Transgens in HEF	[73]
RCAS Vorläufer	murines Mx (mMx)	Huhn, Fibroblasten	Schutzwirkung von mMx gegen Influenza in HEF	[74]
RCAS(BP)A RCAS(BP)E	humane plazentäre Alkalische Phosphatase	Huhn, Embryonen	RCAS Expression während der embryonalen Entwicklung des ZNS	[56, 77]
RCAS(BP)E	<i>sonic hedgehog</i>	Huhn, Embryonen	Sonic hedgehog Expression bei der anterior-posterior Ausbildung der Gliedmaßen	[80]
RCAN A RCON A RCAN(BP)A RCON(BP)A	bakterielle Chloramphenicol Acetyltransferase unter α_{sk} -Aktin-Promotor oder β -Aktin-Promotor	Huhn, Embryonen	Untersuchung der Gewebsspezifität der Promotoren im Hühnerembryo	[57, 58]
RCAS(BP)A	β -Catenin, LEF-1/DKK (Knockdown von β -Catenin)	Huhn, Embryonen	Einfluss von β -Catenin auf die Ontogenese der Leber	[89]
RCAS(BP)B	trunkiertes IgM T μ	Huhn, geschlüpfte Küken	Untersuchungen zur B-Zell-Entwicklung in der Bursa Fabricii beim Huhn	[81-83]
RCAN(BP)A	shRNA gegen GAPDH	<i>tv-a</i> exprimierende humane Zellen	Etablierung des RCAS-Systems für RNAi-Experimente	[87]
RCAS	shRNA gegen Visinin	Huhn, Embryonen	Etablierung des RCAS-Systems für RNAi Experimente in der Retina	[86]

Tabelle 2: Ausgewählte Anwendungsbeispiele des RCAS-Systems

2.1.1.4 Anwendung des RCAS-Systems im Mausmodell

Das RCAS-System wurde nicht nur beim Huhn, sondern auch am Mausmodell eingesetzt [90]. Der Vorteil des RCAS-Systems gegenüber anderen replikationskompetenten retroviralen Vektorsystemen, basierend auf dem Maus-Leukämie-Virus (MLV), war die Möglichkeit vergleichsweise größere Inserts in den Vektor zu klonieren [91, 92]. Säugerzellen sind jedoch in der Regel nicht mit den RSV-basierten RCAS-Vektoren infizierbar, da kein passender Rezeptor auf der Zellmembran exprimiert wird [24]. Dieses Problem wurde einerseits umgangen, indem das aus dem RSV stammende Gen *env* des Vektors RCAS(BP) durch jenes eines ekotropischen (keine Tumoren auslösenden aber in Mauszellen replizierenden) Stamms des MLV ersetzt wurde [91]. Zur Vermehrung des RCAS(BP)eco benannten Vektors wurde die Hühnerfibroblastenzelllinie DF-1 stabil mit dem passenden Rezeptor transfiziert. Eine zweite Strategie war, das Gen *env* des RCAS-Virus durch jenes eines amphotropischen (auch in anderen als Mauszellen replizierenden) MLV-Stamms zu ersetzen [91]. Eine weitere Möglichkeit zum Einsatz des RCAS-Systems bieten transgene Mäuse. Es konnte gezeigt werden, dass *tv-a* exprimierende Mauszellen mit RCAS(BP)A-transduziert werden können [93, 94]. Auf Grund dessen wurden transgene Mauslinien generiert, welche *tv-a* exprimieren. Hierfür wurden verschiedene Promotoren verwendet, um eine zell- oder gewebsspezifische Expression des Transgens zu erreichen. So wählten Federspiel et al. bei initialen Versuchen den α_{sk} -Aktin-Promotor, um Transgene im Muskel zu exprimieren [58, 95]. Zur Überprüfung der Gewebsspezifität wurde einerseits der von Fekete et al. entwickelte Vektor zur Expression der Alkalischen Phosphatase [77] benutzt. Andererseits wurde ein RCAS(BP)-Vektor eingesetzt, welcher das Gen der bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase enthält [57], womit mittels Enzymaktivität die Expressionshöhe in verschiedenen generierten Mauslinien genauer bestimmt werden konnte.

Mit dem RCAS-System wurden insbesondere Mausmodelle für die Tumorforschung erstellt. So wurde zur Erforschung von Gliomen eine transgene Mäuselinie erstellt, die *tv-a* unter der Kontrolle eines astrozytenspezifischen Promotors exprimiert [96]. In anschließenden Versuchen wurde der Einfluss von

basischem Fibroblastenwachstumsfaktor auf die Bildung von Tumoren näher untersucht [96, 97]. In Versuchen von Lewis et al. wurde der Einfluss von verschiedenen Onkogenen auf die Entwicklung von Pankreastumoren näher erforscht [98]. In einem ähnlichen Ansatz untersuchten Du et al. den Einfluss verschiedener Onkogene auf die Entstehung von Mammatumoren [99, 100]. In diesen Versuchen wurden zusätzlich zu transgenen Mäusen, welche *tv-a* unter der Kontrolle eines mammaspezifischen Promotors exprimierten, auch *wnt-1* transgene Tiere verwendet. Aus beiden Linien wurde eine doppelt transgene Linie erstellt, mit Hilfe derer nun das Zusammenwirken des Onkogens *wnt-1* mit anderen, mittels RCAS(BP) in die Tiere eingeschleuster Onkogene untersucht werden konnte.

Eine neue Entwicklung zum Einsatz von RCAS im Mausmodell machten Seidler et al. im Jahr 2008. Sie erstellten eine transgene Mauslinie, in welcher das Gen des Rezeptors *tv-a* mit einer sog. *loxP*-Sequenz flankiert ist [101]. Diese Sequenzen werden von der sog. *cre*-Rekombinase, welche ursprünglich aus dem Phagen P1 stammt, erkannt und selektiv rekombiniert. Es besteht nun die Möglichkeit die generierte *tv-a* transgene Mauslinie mit einer *cre*-transgenen Linie zu verpaaren und eine doppelt transgene Linie zu erstellen. Das zwischen den *loxP* Sequenzen liegende Gen wird durch die nun auch exprimierte *cre*-Rekombinase je nach Orientierung der *loxP* Sequenzen entweder herausgeschnitten oder aktiviert. Da eine Reihe von *cre* transgenen Mauslinien existiert, welche das Transgen gewebs- und zeitspezifisch bzw. induzierbar exprimieren, besteht nun die Möglichkeit die *tv-a* -Expression in gleicher Weise zu beeinflussen. Seidler et al. konnten mit diesem System erfolgreich den gewebsspezifischen RCAS-Gentransfer des Onkogens *Kras*^{G12D} im Pankreas zeigen. Zusätzlich gelang ihnen auch der Transfer von shRNA gegen das Tumor Suppressor Gen TP53, was eine massive Tumorbildung zur Folge hatte [101].

2.1.1.5 Umgang mit RCAS

Obwohl bei der Verwendung des RCAS-Systems replikationsfähiges Virus gebildet wird, gibt es für den Umgang mit diesen Vektoren nur sehr begrenzte Sicherheitsanforderungen. Da die Infektion von ASLV rezeptorvermittelt erfolgt [24], können nur Zellen, welche den entsprechenden Rezeptor exprimierten,

infiziert werden. Die Rezeptoren für die verschiedenen Subtypen von ASLV (*tv-a*, *tv-b* und *tv-c*) werden nur auf aviären Zellen exprimiert. Daher ist eine Infektion von Säugern ausgeschlossen. Bei Überwindung dieser Infektionsbarriere (z. B. in transgenen Zelllinien) können RCAS-infizierte Säugerzellen zwar Transgen exprimieren, jedoch kann praktisch kein infektiöses Virus produziert werden [93, 95]. Die Verwendung von ASLV-kontaminierten Vakzinen in der Vergangenheit lieferte keinerlei Hinweise auf Humanpathogenität [102]. Die Übertragung von ASLV findet einerseits gametogen und kongenital über das Eiklar, andererseits auch horizontal über Körperflüssigkeiten statt [34]. Die Tenazität der Viruspartikel ist jedoch sehr niedrig [103]. Die Viren sind ubiquitär bei Hühnern vorhanden, eine Erkrankung erfolgt jedoch nur bei ca. 2% der Tiere. Die Viren verursachen damit keine Krankheitsepidemien [34].

In einer Stellungnahme der *Zentralen Kommission für die biologische Sicherheit* des Robert-Koch-Instituts wurden langsam transformierende ASLV daher in die Risikogruppe 1 eingestuft [104]. Da durch die gentechnische Übertragung von Zytokin- oder Zytokinrezeptorgenen auf RCAS-Viren nicht mit einer Veränderung der oben genannten Eigenschaften zu rechnen ist, sind auch die entstehenden RCAS-Vektoren der Risikogruppe 1 zuzuordnen. Arbeiten mit dem RCAS

System sind daher in allen Forschungslaboren und Tierhaltungen der Sicherheitsstufe 1 (S1) möglich.

2.1.2 Weitere Möglichkeiten für die Durchführung funktionell-genomischer Studien beim Huhn

Erste Experimente mit virusvermitteltem Gentransfer waren bei der Maus bereits um 1975 erfolgreich [105, 106]. In den 1980er Jahren wurden durch die Entwicklung der Vorkerninjektion neben Mäusen auch andere transgene Nutztierspezies geschaffen [107, 108]. Solche Interventionen sind am Vogelembryo nicht möglich, da sich die ersten Entwicklungsstadien des Vogelembryos bereits im Muttertier vollziehen und daher schwer zugänglich sind [109]. Nach der Eiablage umfasst der Hühnerembryo bereits ca. 60.000 Zellen [110]. Daher wurde erst ca. 20 Jahre später erstmals von Gentransfer im aviären Organismus berichtet [111]. Grundsätzlich kann zwischen virusvermitteltem

Gentransfer, DNA-Mikroinjektion und zellbasierten Verfahren unterschieden werden. Mittels virusbasierten Methoden kann, abhängig vom verwendeten Vektor, somatischer aber auch Keimbahn-Gentransfer erreicht werden.

2.1.2.1 Viraler Gentransfer

Gentransfer mit Vektoren der aviären Leukose/Sarkom-Viren

Erstmals publizierten Salter et al. die Erstellung transgener Hühner mittels replikationskompetenter Retikuloendotheliose und aviärer Leukoseviren [112]. Hier wurde das Virus in den Dotter frisch gelegter, befruchteter Eier der retrovirusfreien Hühnerlinie „0“, nahe dem Embryo injiziert. Bei dieser Methode ist eine Infektion von Keimzellen grundsätzlich möglich. Da in diesen Versuchen vermehrungsfähiges Virus verwendet wurde, ist eine ständige Infektion der Zellen des Wirtstiers gewährleistet. Virämische männliche Tiere wurden für die Weiterzucht zur Erstellung transgener Linien benutzt. Einen großen Nachteil dieses Verfahrens stellte die Ineffizienz der Keimbahninfektion dar. Eine Weiterentwicklung dieser Vektoren ist das in dieser Arbeit verwendete RCAS-Gentransfersystem.

Um die Nachteile der Virusausscheidung zu umgehen [111], wurden auch replikationsdefiziente Retroviren für Gentransferversuche verwendet [113-115]. Bei diesem Verfahren fehlen dem Virus eines oder mehrere der Strukturgene *gag*, *pol* und *env*, welche für essentielle Proteine zur Virusvermehrung und – partikelbildung kodieren [24]. Damit komplette Viruspartikel produziert werden können, wird ein sog. Verpackungskonstrukt kotransfiziert, welches die fehlenden Gene enthält [116]. Auch in diesen Versuchen wurde das Virus ins befruchtete, noch unbebrütete Ei injiziert. Auf Grund hoher Virustiter konnte die Infektion vieler embryonaler Zellen gewährleistet werden. Harvey et al. entwickelten zum Screening der Tiere ein Hochdurchsatzverfahren, bei dem DNA aus Blutzellen isoliert und auf Transgenintegration überprüft wurde [115]. Das Verfahren erwies sich jedoch als relativ ineffizient, da aus nur ca. 1% der injizierten Embryonen in der Weiterzucht zu verwendende, Keimbahn-transgene männliche Tiere entstanden [117]. Obwohl mit diesen Techniken nun die Möglichkeit der Erstellung Keimbahn-transgener Tiere möglich war, war die Transgenexpression in diesen instabil und variabel, was auf transkriptionelles Silencing zurückgeführt

wurde [117]. Dieses Problem war bereits in transgenen Mäusen beschrieben worden, welche mit Hilfe eines auf dem Maus-Leukämie-Virus basierenden Vektors hergestellt worden waren [118].

Diese Studien zeigten, dass die Erstellung Keimbahn-transgener Hühner mittels retroviraler Vektoren zwar grundsätzlich möglich [115, 117], jedoch relativ ineffizient ist. Daher wurden retrovirale Systeme vor allem für somatischen Gentransfer verwendet (siehe 2.1.1.3).

Erstellung transgener Hühner mittels lentiviralem Gentransfer

Einen Fortschritt bei der Generierung Keimbahn-transgener Hühner brachte der Einsatz von lentiviralen Vektoren, mit welchen bei verschiedenen Säugetierarten bereits relativ effizient transgene Tiere erzeugt werden konnten [119, 120]. Diese sind in der Lage, neben sich teilenden Zellen auch nicht proliferierende Zellen zu transduzieren [119]. Diese wurden im Jahr 2004 von McGrew et al. auch für den Einsatz beim Haushuhn etabliert [2]. Hierbei diente der Erreger der equinen infektiösen Anämie (EIAV) als Basis zur Vektorkonstruktion. Dieses System basiert auf einem replikationsdefizienten Virus, welches nur mit Hilfe eines Helfervirus infektiöse Partikel bilden und somit zur Transduktion verwendet werden kann [2, 121]. Hierzu wurden beide Konstrukte gleichzeitig in die humane Nierenzelllinie 293-T transfiziert und Überstand zur Konzentration von Virus gewonnen. Dieses wurde in die Keimscheibe frisch gelegter, befruchteter Eier injiziert. Männliche Tiere der ersten Generation (G0) vererbten das Gen mit einer Häufigkeit zwischen 4% und 45% an die Nachkommen (G1). Auch die Weitervererbung des Transgens von der G1 zur G2-Generation blieb stabil. Da die Transgenexpression jedoch in verschiedenen Geweben auf Grund des eingesetzten Promotors aus dem Cytomegalievirus (CMV) sehr unterschiedlich war, generierten Chapman et al. transgene Hühner mittels eines HIV-1-basierten lentiviralen Vektors mit Phosphoglycerol-Kinase-Promotor. Sie erzielten damit eine gleichmäßige Transgenexpression im gesamten Organismus [122]. Eine weitere Verfeinerung des lentiviralen Systems führten Scott et al. ein, indem sie mittels eines neuronenspezifischen Promotors erstmals gewebsspezifische Transgenexpression erreichten [123].

Neben dem Einsatz in der funktionalen Genomanalyse waren transgene Tiere

schon lange als potentielle Produzenten für biopharmazeutische Wirkstoffe gehandelt worden [124]. Das Huhn könnte hierbei eine besondere Rolle spielen, da im Ovidukt Proteine ins Eiklar sezerniert werden. Lillico et al. erstellten 2007 mit Hilfe eines EIAV-basierten Vektors erstmals transgene Hühner, welche humanes Interferon-1 β (*IFN-1 β*) unter dem Ovalbumin-Promotor exprimierten [125]. Sie erreichten damit eine oviduktspezifische Expression von *IFN-1 β* und somit eine Sekretion des Proteins ins Eiklar. Ein Vorteil des Huhns als Bioreaktor im Gegensatz zu Säugetieren, liegt im geringeren Aufwand bei der Haltung und der leichten Zugänglichkeit zu den Eiern. Gleichzeitig ist das Huhn phylogenetisch weiter vom Menschen entfernt, so dass die Gefahr der Kreuzreaktivität der produzierten Moleküle mit Rezeptoren im Hühnerorganismus geringer ist [126].

Somatischer Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren

Eine andere Möglichkeit zum somatischen Gentransfer stellen Adenoviren da. Im Gegensatz zu Retroviren haben diese ein DNA-Genom und sind unbehüllt. Sie sind in der Lage, im Kern der Wirtszelle zu replizieren und hierfür zelluläre Enzyme zu benutzen [127]. Im Gegensatz zu Retroviren integrieren sie ihr Genom jedoch nicht ins Wirtsgenom. Die Infektion der Wirtszelle erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose.

Adenoviren wurden beim Geflügel bisher vornehmlich als Vehikel für Vakzinen und andere immunmodulierende Moleküle eingesetzt. Erstmals publizierten Sheppard et al. den Einsatz eines adenoviralen Vektors beim Huhn zur Produktion eines Impfantigens gegen Infektiöse Bursitis [128]. Dieses konnte in SPF-Tieren eine schützende Immunantwort auslösen. Johnson et al. nutzten einen adenoviralen Vektor zur Überexpression von IFN- γ . Obwohl keine *in vivo*-Tests zur Bestimmung der Transgenexpression erfolgten, konnte gezeigt werden, dass behandelte Broiler schneller an Gewicht zunahmen sowie bei einer Infektion mit dem Parasiten *Eimeria tenella* weniger Gewicht verloren [129]. In jüngster Zeit wurden adenovirale Vektoren vor allem in Studien zur Influenzavakzinierung eingesetzt. So berichteten Gao et al. von Erfolgen beim Einsatz eines Adenovirus-basierten Influenzaimpfstoff mit dem Hämagglutinin (HA) eines hochpathogenen H5N1-Stammes [130]. Toro et al. entwickelten ein Verfahren, in dem adenovirale

Vektoren mit dem HA eines H5N9 Stammes *in ovo* verabreicht wurden [131, 132]. Auch hier konnte ein Schutz vor Influenzainfektionen erreicht werden. Beide Gruppen wiesen die Transgenexpression nicht direkt nach, sondern bestimmten Antikörpertiter gegen das verwendete HA und zeigten in Infektionsversuchen die Wirksamkeit der Adenovirus -basierten Vakzinen.

Da Adenoviren nicht ins Genom der Wirtszelle integrieren, ist bei dieser Methode Gentransfer nur zeitlich begrenzt möglich und nicht vererbbar. Es liegen keine detaillierten Expressionsstudien vor, daher können die Möglichkeiten des Einsatzes adenoviraler Vektoren in funktionell-genomischen Studien beim Huhn nicht abschließend beurteilt werden. Für die Erstellung temporär proteinexprimierender Tiere wie auch zur Vakzinierung der Tiere stellen adenovirale Systeme jedoch eine erfolgversprechende Methode dar.

2.1.2.2 DNA Mikroinjektion

Die Injektion von DNA-Konstrukten in Vorkerne von Zygoten war eine der ersten etablierten Techniken zur Erstellung Keimbahn-transgener Tiere [107, 108] und wird immer noch routinemäßig eingesetzt [133].

Auch für das Haushuhn wurden Methoden zur Mikroinjektion entwickelt. Im Jahr 1994 publizierten Love et al. die Erstellung Keimbahn-transgener Hühner durch Injektion von Plasmid in die Keimscheibe von Zygoten [134]. Die Effizienz des Systems war jedoch außerordentlich niedrig, von mehr als 120 injizierten Embryonen schlüpften nur sieben. Von diesen wiederum vererbte nur ein Hahn das Transgen weiter. Auch Sherman et al. erstellten eine transgene Hühnerlinie, welche das Transgen *mariner* aus *Drosophila melanogaster* trug [135]. Die Schlupfrate der G0 Tiere lag auch in diesen Versuchen relativ niedrig. Es konnte die Übertragung des Transgens bis zur G2 Generation gezeigt werden. In beiden Arbeiten wurden befruchtete Eizellen aus dem Ovidukt entnommen und zunächst in synthetische Eileiterflüssigkeit überführt. Danach wurden die Embryonen in Surrogat-Eierschalen bis zum Schlupf kultiviert. Diese Prozeduren erfordern ein hohes Maß an technischen Fertigkeiten und Erfahrung, was eine Schwierigkeit bei der Etablierung dieser Methode und ein Grund für dessen Ineffizienz darstellt [136].

2.1.2.3 Zellbasierte Techniken

Eine weitere Möglichkeit zur Erstellung transgener Tiere ist der Einsatz von Zellen, welche Potential zur Keimbahnbesiedelung besitzen. Diese werden isoliert, kultiviert und mit dem Gen von Interesse transfiziert. Transgen-exprimierende Zellen werden in einen Embryo verpflanzt und mit dem daraus resultierenden Mosaik wird eine transgene Linie erstellt [137]. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass hier auch die Möglichkeit des sog. *gene targetings* besteht. Hierbei werden bekannte Genomabschnitte durch homologe Rekombination mit dem Transgen ausgetauscht. Es besteht also die Möglichkeit, das Transgen gezielt an eine Stelle im Wirtsgenom zu integrieren. Die Transgensequenz kann sowohl zu einer Inaktivierung des Zielgens (*knockout*) benutzt werden, als auch eine definierte Modifikation enthalten (*knockin*) [138]. Lange Zeit waren diese Methoden nur für die Maus verfügbar, wurden jedoch im Laufe der Zeit auch für weitere Spezies wie Schweine oder Rinder etabliert [139, 140]. Transgene Mausmodelle werden standardmäßig über diesen Weg erzeugt.

Beim Huhn wurde seit 1990 mehrfach die Isolierung embryonaler Zellen publiziert, welche sich bei der Transplantation in einen anderen Embryo als keimbahngängig herausstellten [141-144]. In diesen Arbeiten erfolgte jedoch weder eine Charakterisierung noch eine Kultivierung dieser Zellen. Erst 1996 berichteten Pain et al. von der Kultivierung embryonaler Stammzellen, welche aus Embryonen der Stadien IX-XI (nach Hamburger und Hamilton [78]) präpariert worden waren. Diese Zellen wiesen in Kultur ähnliche Merkmale wie embryonale Stammzellen der Maus auf, wie beispielsweise die Abhängigkeit von bestimmten Wachstumsfaktoren, hohe Telomeraseaktivität, Morphologie und Expression von Oberflächenmolekülen [145]. Im Folgenden gelang die Erstellung embryonaler Stammzelllinien, die jedoch mit zunehmender Kultivierungsdauer dazu tendierten ihre Pluripotenz zu verlieren [145, 146]. Im Jahr 2005 konnten van de Lavoie et al. erfolgreich embryonale Stammzelllinien erstellen, welche auch nach Kultivierung und genetischer Modifikation ihre Pluripotenz behielten, jedoch nicht die Fähigkeit zur Keimbahnbesiedelung zeigten [147].

Ein weiterer zellulärer Ansatz zur Erstellung von Hühnern mit genetischen Modifikationen sind primordiale Keimzellen. Dies sind die Vorläuferzellen von

Spermien und Eizellen. In der Embryonalentwicklung des Huhns konzentrieren sie sich in der Keimscheibe und besiedeln von dort aus ab dem 3. Tag der Embryonalentwicklung über das vaskuläre System die Gonadenanlagen [109, 148, 149]. Dies ermöglicht ihre Gewinnung aus dem Blut und nachfolgende Kultivierung [3]. Auch primordiale Keimzellen haben bei Übertragung in einen Empfängerembryo die Fähigkeit zur Keimbahnbesiedelung. So wurden auch diese Zellen zur Erstellung von Chimären verwendet [150, 151]. Da es jedoch zunächst nicht gelang die Zellen erfolgreich zu kultivieren, fehlte die Möglichkeit ihrer genetischen Modifikation. Eine Erstellung transgener Hühner mittels primordialer Keimzellen wurde von van de Lavoie et al. [3] erstmalig 2006 publiziert. Hierbei wurden aus primordialen Keimzellen Zelllinien definierten Geschlechts erstellt, welche mittels Transfektion genetisch verändert werden konnten [152]. GFP transfizierte Zellen wurden in Empfängertiere übertragen. Mittels Histologie konnte gezeigt werden, dass die primordialen Keimzellen im Empfänger ausschließlich die Keimbahn besiedelten. Die Effizienz in diesem ersten Schritt lag vergleichsweise höher, als bei anderen Methoden. Von den injizierten Embryonen überlebten mehr als 20% bis zum 14. Embryonaltag.

Ein Nachteil zellbasierter Verfahren ist die relativ lange Zeit, welche bis zum Erhalt proteinexprimierender Tiere benötigt wird, da die G0 Generation erst nach 6 bis 8 Monaten zuchtreif ist. Andererseits erwies sich die Erstellung von Keimbahn-transgenen Hühnern mittels zellbasierter Verfahren bisher am effizientesten. Obwohl beim Einsatz lentiviraler Vektoren auch von einer Transgenvererbung (Generation G0 zu G1) von bis zu 45% berichtet wurde [2], lagen die Zahlen meist aber bei weniger als 1% [115, 122]. Im Gegensatz dazu reichen die Vererbungsrate bei der Verwendung embryonaler Stammzellen bzw. primordialer Keimzellen von durchschnittlich 30% bis zu mehr als 90% [3, 136].

2.2 Die Rolle von Zytokinen in der Entwicklung von B-Zellen

Bei Mensch und Maus vollzieht sich die initiale Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark. Hier findet in mehreren Schritten die Ausbildung und Diversifizierung des B-Zell-Rezeptors durch Gen-Rearrangement statt [153]. Von dort aus wandern die B-Zellen in sekundäre lymphatische Organe aus, wo sich die weitere Entwicklung zu naiven B-Zellen vollzieht. Nach Antigenkontakt beginnen diese zu proliferieren und unterliegen in germinalen Zentren weiteren Reifungsprozessen, wodurch sie sich schließlich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen sowie B-Gedächtniszellen differenzieren (siehe Abbildung 5).

Das Haushuhn hingegen zählt zu den sog. GALT-Spezies, zu denen viele unserer Haussäugetiere, wie beispielsweise Schweine [154], Schafe und Rinder [155] oder Kaninchen [156, 157] zählen. Bei dieser Gruppe von Tieren vollzieht sich die Entwicklung der B-Zellen im Darm assoziierten lymphatischen Gewebe (*gut associated lymphoid tissue* = GALT). Anders als bei den Säugetieren in dieser Gruppe, besitzen Vögel hierfür ein spezialisiertes Organ, die Bursa fabricii. Sie stellt eine Ausstülpung des Enddarms dar, welche jedoch mit dem Erreichen der Geschlechtsreife zurückgebildet wird. Die ersten Entwicklungsschritte der B-Zellen finden beim Huhn bereits ab dem 5. Tag der Embryonalentwicklung in Dottersack, Knochenmark, Milz und Leber statt. In diesem Stadium werden die verschiedenen Gensegmente des B-Zell-Rezeptors rearrangiert (*VDJ-rearrangement*) [158]. Ab dem 9. Embryonaltag besiedeln B-Zellvorläufer die Bursa fabricii [159, 160], wo in den folgenden Tagen neben der weiteren Rezeptor-Diversifizierung (*gene conversion*) [158, 161] eine massive Expansion der B-Zellen beginnt [159, 162]. Diese Proliferationsphase endet um den Zeitpunkt des Schlupfes, gleichzeitig beginnt die Emigration von B-Zellen aus der Bursa fabricii. Jedoch wandert nur ein geringer Teil der B-Zellen aus, die restlichen Zellen gehen in Apoptose [163-165]. Die mit einem funktionsfähigen Rezeptor ausgestatteten B-Zellen siedeln sich größtenteils in den peripheren lymphatischen Organen an. Dort bilden sie nach der B-Zell-Aktivierung sog. germinale Zentren aus. In diesen Strukturen vollziehen sich weitere Entwicklungsschritte wie Immunglobulin-Klassenwechsel [166] und erneute Rezeptordiversifizierungen durch *gene conversion* und somatische Hypermutation [167, 168]. Die B-Zell

Reifung bei Mensch und Maus sowie beim Huhn ist in Abbildung 5 vergleichend dargestellt.

Bei Mensch und Maus spielen Zytokine in der B-Zell-Reifung eine große Rolle. Eine besondere Bedeutung kommt hier den Zytokinen der Tumor-Nekrose-Faktor Familie (TNF-Familie) zu. Ein wichtiger, bereits für das Haushuhn beschriebener Vertreter ist der B-Zell-aktivierende Faktor der TNF-Familie (BAFF) [12, 13, 169-172], welcher in dieser Arbeit zur Etablierung und Charakterisierung der RCAS-Gentransfertechnologie eingesetzt wurde. Ein weiteres Zytokinsystem, das bei Mensch und Maus die B-Zell-Entwicklung beeinflusst, ist das CD40/CD40L-System [173]. Dieses wurde nun auch für das Huhn beschrieben und *in vitro*-Studien weisen darauf hin, dass es auch in dieser Spezies eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen spielt [174, 175].

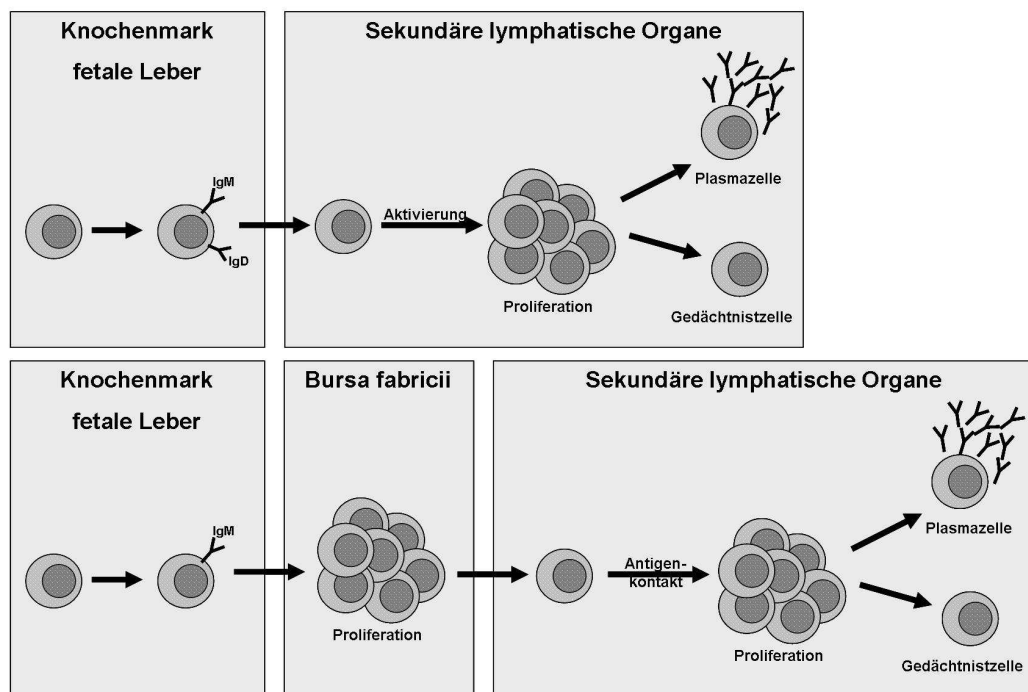


Abbildung 5: Vergleich der B-Zell-Reifung bei Mensch/Maus und Huhn

2.2.1 Das Zytokin BAFF

Das humane Zytokin BAFF (B-Zell-aktivierender Faktor der TNF-Familie) wurde im Jahr 1999 zeitgleich von mehreren Gruppen durch Datenbankrecherchen identifiziert und kloniert. Daher wurde es neben BAFF [176] zunächst auch mit

THANK (TNF homologue that activates apoptosis, NFκB and c-Jun NH2-terminal kinase) [177], BlyS (B lymphocyte stimulator) [178], TALL-1 (TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand 1) [179] sowie zTNF4 und TNFSF13b (TNF-superfamily member 13b) [180] benannt. Mittlerweile herrscht in Europa der Terminus BAFF, im amerikanischen Raum jedoch die Bezeichnung BlyS vor. Zur gleichen Zeit wie humanes BAFF wurde auch das Maushomolog (muBAFF) identifiziert [176]. Mittlerweile wurden auch homologe Proteine bei Huhn [13], Ente [181], Gans [182], Schwein [183] und Kaninchen [184, 185] beschrieben. BAFF ist Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Familie. Diese Zytokinfamilie wurde nach dem zuerst entdeckten Mitglied TNFα benannt [186] und besitzt mittlerweile 19 Liganden [187]. Die zugehörige Familie der TNF-Rezeptoren enthält bislang 29 Mitglieder.

2.2.1.1 BAFF bei Mensch und Maus

Struktur

BAFF ist als Vertreter der TNF-Superfamilie ein Typ II Membranprotein. Es hat eine Länge von 285 Aminosäuren und wird als Homotrimer an der Zelloberfläche exprimiert [188]. Neben dieser membrangebundenen Form kommt es auch als lösliches Protein vor, da es von Proteasen vom Furin-Typ abgespalten werden kann [189].

Rezeptoren

BAFF kann an drei Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie binden. Zum einen bindet es an die Moleküle BCMA (*B cell maturation antigen*) und TACI (*transmembrane activator and CAML interactor*), welche auch das TNF-Familienmitglied APRIL (*a proliferation inducing ligand*) [176] als Ligand besitzen. Zusätzlich bindet BAFF an den humanen BAFF-Rezeptor (BAFF-R) [170] (siehe Abbildung 6). Bei allen drei Rezeptoren handelt es sich um Typ III Membranproteine, das heißt der Aminoterminus ist wie bei Membranproteinen des Typs I in der Membran verankert, jedoch fehlt ein Signalpeptid [170]. Der Rezeptor BCMA erhielt seinen Namen, weil er fast ausschließlich bei muren B-Zellen vorkommt. Namensgebend für TACI war seine Entdeckung bei der Suche nach Proteinen, welche mit dem Protein CAML (*calcium modulator and*

cyclophilin ligand) interagieren [190]. TACI ist auf der Membran von B- und T-Zellen lokalisiert. Der BAFF-R bindet als dritter Vertreter der Gruppe ausschließlich an den Liganden BAFF. Bemerkenswert ist, dass das Molekül ein relativ untypischer Vertreter der TNF-Rezeptoren ist, da er nur eine trunkierte Variante der für TNF-Rezeptoren typischen Domäne enthält [191, 192]. Das Protein wird vorwiegend von B-Zellen exprimiert, kommt jedoch auch bei einigen T-Zell-Populationen vor [193]. BAFF bindet mit hoher Affinität an die Rezeptoren BAFF-R und TACI, während die Affinität zu BCMA weitaus geringer ist [194]. Das in der Maus beschriebene Rezeptor-Ligand-System ist mit jenem im Menschen identisch [194].

Funktionen

BAFF ist bei Mensch und Maus ein wichtiger Überlebensfaktor für periphere B-Zellen nach dem Verlassen des Knochenmarks [169-171], wobei diese Funktion hauptsächlich durch den BAFF-R vermittelt ist [195, 196]. Des Weiteren vermitteln Signale dieses Zytokin/Ligand-Systems das Überleben von Plasmazellen. Hierbei dürfte neben dem BAFF/BAFF-R -Signalling auch die APRIL/BCMA-Interaktion eine wichtige Rolle spielen [197, 198]. Eine zusätzliche Rolle scheint BAFF bei der Bildung von germinalen Zentren zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass BAFF- oder BAFF-R-defiziente Mäuse keine funktionellen germinalen Zentren ausbilden [196, 199]. Bei Mensch und Maus beeinflusst BAFF nach Antigenkontakt den Klassenwechsel zu IgG und IgA, in Anwesenheit von IL-4 auch den Wechsel zu IgE [200, 201].

Neben diesen physiologisch im Körper ablaufenden Prozessen spielt BAFF jedoch auch in einer Reihe von autoimmunmedierten Erkrankungen eine Rolle. Erste Hinweise darauf wurden an BAFF überexprimierenden Mausmodellen gewonnen. Die Tiere zeigten eine massive Erhöhung der B-Zellen in Blut und Milz und wiesen Symptome von Autoimmunerkrankungen auf [202-204]. Auch bei Patienten mit autoimmunmedierten Erkrankungen wie systemischem Lupus erythematodes, dem Sjögren Syndrom oder rheumatoider Arthritis konnten erhöhte BAFF-Spiegel beobachtet werden [205-207].

Expression

Die Produktion des Zytokins BAFF erfolgt in zwei von einander unabhängigen Pools von Zellen. Einerseits gibt es noch nicht näher spezifizierte, strahlungsresistente Zellen (wahrscheinlich Stromazellen), welche das Zytokin kontinuierlich produzieren und die Hauptquelle für BAFF in der B-Zell Homöostase darstellen [208, 209]. Zusätzlich dazu besteht die Möglichkeit Zytokin-induzierter BAFF Produktion durch myeloide Zellen, was der Anhäufung zusätzlicher B-Zellen beispielsweise im Rahmen von Entzündungsgeschehen dient [189, 208, 210, 211]. So werden B-Zell-medierte Autoimmunreaktionen in Zusammenhang mit erhöhter BAFF Produktion aus diesem Pool von Zellen in Zusammenhang gebracht [209]. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass auch aktivierte B-Zellen in der Lage sind BAFF zu produzieren [212]. Dies bedeutet einerseits, dass B-Zellen ihre Überlebensdauer autokrin beeinflussen, andererseits können dadurch jedoch auch chronische Entzündungen aufrechterhalten werden.

2.2.1.2 Das Zytokin chBAFF beim Huhn

Struktur

Beim Haushuhn wurde das Zytokin BAFF (im Folgenden chBAFF) 2003 in einer EST (*expressed sequence tags*) Datenbank identifiziert und daraufhin kloniert [13]. Es besitzt mit 76% eine vergleichsweise hohe Homologie zum humanen Protein. Die Sequenz umfasst 271 Aminosäuren, zudem eine mögliche Schnittstelle für Proteasen vom Furin-Typ. Das Vorkommen eines APRIL-Homologes wurde für das Haushuhn bisher nicht beschrieben, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Rezeptoren

Zunächst war der Rezeptor für chBAFF nicht näher charakterisiert. In durchflusszytometrischen Analysen mit rekombinant hergestelltem chBAFF konnte jedoch festgestellt werden, dass dieses nur an B-Zellen bindet [13]. Im Jahr 2008 schließlich konnten die Rezeptoren chBAFF-R und chTACI gefunden werden. Das Gen für chBAFF-R konnte über seine Sequenzhomologie zum humanen BAFF-R in EST Datenbanken identifiziert werden. Die Lage des Gens für chTACI konnte über bekannte benachbarte Homologe vorausgesagt werden,

woraufhin die Intron-Exon-Struktur des Gens vorhergesagt und die zugehörige cDNA aus einer cDNA-Bibliothek gewonnen werden konnte. Für chBCMA konnte kein funktionelles Gen entdeckt werden. An der vorhergesagten Lokalisation wurde stattdessen eine homologe Sequenz gefunden, welche jedoch durch ein Stoppkodon unterbrochen ist [213]. Daher scheint es relativ unwahrscheinlich, dass an anderer Stelle des Genoms ein Homolog dieses Gens vorhanden ist. Bei der Charakterisierung der Rezeptoren chBAFF-R und chTACI konnten beide in der Bursa fabricii, aber auch in Zäkaltonsillen, Milz und der Harder'schen Drüse nachgewiesen werden. Die Expressionshöhe in den einzelnen Geweben korrelierte dabei mit dem jeweiligen B-Zell-Gehalt [213], was darauf schließen lässt, dass die Moleküle überwiegend auf diesen Zellen zu finden sind.

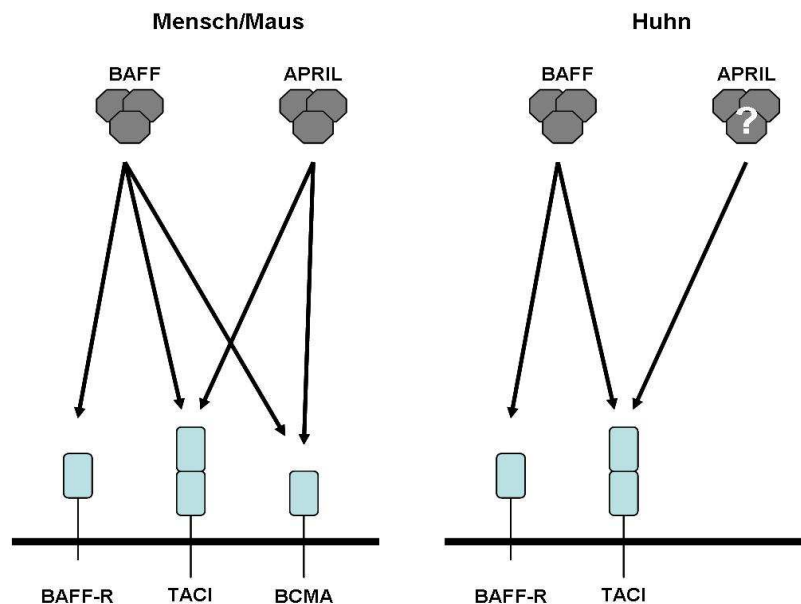


Abbildung 6: BAFF und APRIL mit den zugehörigen Rezeptoren bei Mensch/Maus und Huhn
Bei Mensch und Maus existieren für BAFF und APRIL zwei gemeinsame Rezeptoren, BCMA und TACI. An den BAFF-R bindet ausschließlich das Zytokin BAFF. Für das Huhn konnte die Existenz eines APRIL-Homologs bisher nicht nachgewiesen werden. ChBAFF bindet an die Rezeptoren chBAFF-R und chTACI. Das Vorkommen von BCMA beim Huhn ist auszuschließen.

Funktionen

In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass chBAFF-R sowie chTACI an chBAFF binden. Zudem konnte ein lösliches chBAFF-R-Fusionsprotein *in vivo* die Wirkung von chBAFF auf B-Zellen inhibieren [213].

Auch für das Haushuhn konnte ein wichtiger Einfluss von chBAFF auf B-Zellen gezeigt werden [13, 172]. Obwohl zwar die Zahl lebender B-Zellen in Milzzellkulturen mit chBAFF-Zusatz gegenüber Kontrollen signifikant erhöht war, nahm die Zellzahl innerhalb von 72 Stunden jedoch trotzdem rapide ab. Diese chBAFF induzierte Erhöhung der B-Zell-Zahlen war nicht auf eine Proliferation, sondern auf eine verlängerte Lebensdauer der Zellen zurückzuführen [13]. Küken, denen rekombinant hergestelltes chBAFF-Flag verabreicht worden war, wiesen im Vergleich zu Tieren, welche Kontrollprotein erhalten hatten, doppelt so hohe B-Zell-Zahlen in der Milz und den Zäkaltonsillen auf [13]. Auch in B-Zell-Kulturen aus *Bursae fabricii* überlebten nach chBAFF-Flag-Zugabe länger. Interessanterweise war *in vivo* kein Einfluss auf die Größe und das Gewicht der *Bursa fabricii* festzustellen [12, 13].

Wie bereits erwähnt, besteht eine außerordentlich hohe Homologie zwischen den BAFF-Proteinen von Mensch und Huhn. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kreuzreaktivität zwischen chBAFF und den humanen Rezeptoren BAFF-R und BCMA besteht. Daher konnte ein rekombinantes Fusionsprotein aus humanem BCMA und einem humanen Fc-Teil (im Folgenden huBCMA-Fc) als chBAFF neutralisierender, löslicher Decoy-Rezeptor in *in vivo*-Versuchen eingesetzt werden. Küken, welche dieses Protein verabreicht bekamen, wiesen signifikant erniedrigte B-Zell-Zahlen in der Milz auf [12].

Da sowohl chBAFF als auch ein zugehöriger Rezeptor schon während der Embryonalentwicklung exprimiert werden [13], lag die Vermutung nahe, dass, anders als bei Mensch und Maus, chBAFF Einfluss auf frühe B-Zell-Stadien haben könnte. Am Embryonaltag 18 entnommene *Bursae fabricii* von Embryonen, welchen drei Tage zuvor huBCMA-Fc injiziert wurde, zeigten in der Histologie eine dramatische Verringerung von B-Zell-Follikeln [214]. Mangels geeigneten Systems konnten bislang jedoch keine Untersuchungen an älteren Hühnern durchgeführt werden.

Expression

Das Zytokin chBAFF ist vorrangig in der *Bursa fabricii* lokalisiert [13]. In Northern Blot Analysen wurde in diesem Organ bereits um den 14. Embryonaltag chBAFF-Expression festgestellt, welche im weiteren Verlauf der

Embryonalentwicklung weiter anstieg. Mittels *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass das Zytokin in Mark und Rinde von Bursafollikeln exprimiert ist. Zudem konnte um den Schlupf auch in der Milz chBAFF-Expression nachgewiesen werden. In zusätzlichen Northern Blot Analysen von burssektomierten, also B-Zell depletierten Tieren und B-Zell depletierten Milzzellsuspensionen konnte keine chBAFF mRNA gefunden werden. Dies zeigte, dass das Zytokin, im Gegensatz zum humanen Homolog, ausschließlich von B-Zellen exprimiert sein muss [12].

2.2.2 Das CD40/CD40L-System

Ein weiteres Zytokinsystem der TNF-Familie, welches bei Mensch und Maus die Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen maßgeblich beeinflusst, ist das CD40/CD40L-System.

Im Jahr 1992 konnte erstmals gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen dem humanen Oberflächenmolekül CD40 auf B-Zellen und einem zugehörigen Liganden auf T-Zellen zur Aktivierung von B-Zellen führt [215]. Das Protein wurde neben CD40L zunächst auch unter den Bezeichnungen TRAP (*TNF related activation protein*) [216] und gp39 [217] beschrieben. Auch der Terminus CD154 wird weitläufig verwendet. Zur gleichen Zeit wie das humane Protein wurde auch in der Maus ein homologes Molekül beschrieben [218].

Im Folgenden konnte das schon lange bekannte X-chromosomal rezessiv vererbte Hyper-IgM-Syndrom des Menschen mit einem Defekt im Gen für CD40L in Zusammenhang gebracht werden [219, 220].

2.2.2.1 Das CD40/CD40L-System in der B-Zell-Entwicklung bei Mensch und Maus

Struktur

Wie auch huBAFF ist CD40L ein Typ II Transmembranprotein. Auch dieses Molekül kommt als Homotrimer vor und existiert neben der membrangebundenen, auch in einer löslichen Form [221]. Im Gegensatz zu anderen Rezeptor-Ligand-Systemen innerhalb der TNF-Familie, bindet CD40L

ausschließlich den Rezeptor CD40. Dieses Typ I Membranmolekül ist ein typischer Vertreter der TNF-Rezeptor-Familie [222, 223]. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Liganden, die als Monomer oder Dimer auf der Zellmembran vorkommenden CD40-Moleküle dazu veranlasst, sich in *lipid rafts* zu Multimeren zusammenlagern, deren Größe Auswirkungen auf die übermittelte Signalstärke hat [224, 225].

Expression

CD40L ist fast ausschließlich auf der Zellmembran aktivierter CD4-positiver T-Zellen zu finden [226, 227]. Daneben existieren auch kleine Subpopulationen anderer Zelltypen, welche dieses Oberflächenmolekül unter bestimmten Bedingungen exprimieren. So konnte es auf CD8-positiven T-Zellen [226], Granulozyten und Mastzellen [228, 229], Thrombozyten [230] und auch B-Zellen [231] nachgewiesen werden. Auf CD4-positiven T-Zellen ist CD40L transient exprimiert [232]. Bereits Minuten nach Aktivierung der T-Helferzellen, welche beispielsweise durch Bindung eines MHC:Peptid-Komplexes ausgelöst werden kann, beginnt eine erste Welle der CD40L-Expression durch präformiertes Protein. Eine zweite Welle tritt ein bis zwei Stunden später durch neu synthetisiertes Protein ein [233].

Der zugehörige Rezeptor CD40, ist meist konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert. B-Zellen tragen dieses Molekül in sämtlichen Entwicklungsstufen auf ihrer Membran. [234-236]. So sind bereits in den ersten Tagen der Embryonalentwicklung CD40-positive Zellen in der fetalen Leber und dem Knochenmark nachweisbar [234]. Im weiteren Verlauf der Entwicklung ist der Rezeptor auf naiven sowie reifen B-Zellen wie auch auf Plasmazellen nachweisbar [235].

Auch auf Monozyten [237], Makrophagen [235] und dendritischen Zellen [236] konnte CD40 nachgewiesen werden, hierbei spielt das Molekül eine Rolle in der T-Zell-Aktivierung [238, 239]. Darüberhinaus exprimieren auch verschiedene andere Gewebszellen im Zuge von Entzündungsprozessen sowie Tumorzellen das CD40 Molekül [240, 241].

Funktionen

Wie bereits erwähnt, erfüllt das CD40/CD40L-System im menschlichen Organismus vielfältige Rollen. Physiologisch ist es vorwiegend als kostimulatorisches System bei der Aktivierung von Zellen des Immunsystems von Bedeutung. Im Folgenden soll näher auf die Aufgaben des CD40/CD40L-Systems bei der Differenzierung von B-Zellen eingegangen werden.

Mit der Entdeckung von CD40L-Defekten als Ursache des X-chromosomal rezessiv vererbten Hyper-IgM-Syndrom des Menschen war klar, dass das Zytokin-Ligand-System wichtige Einflüsse auf die Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen haben musste [219]. Patienten zeigen erhöhte IgM-Spiegel, jedoch ausgesprochen niedrige Spiegel an IgG, IgA und IgE. In den Lymphknoten konnten keinerlei germinale Zentren gefunden werden. Die Anzahl zirkulierender B- und T-Zellen erwies sich jedoch als normal [242]. Im Gegensatz dazu wiesen CD40L-knockout Mäuse keine Veränderungen der IgM-Plasmaspiegel auf. Die IgA-Spiegel waren jedoch vermindert und IgE war überhaupt nicht nachweisbar. Analog zur Defizienz beim Menschen konnten auch in diesen Tieren keinerlei germinale Zentren gefunden werden. Die Immunantwort auf T-Zell abhängige Antigene war stark eingeschränkt [243, 244].

Die Symptome dieser Immundefizienzen lieferten wertvolle Hinweise auf die physiologischen Funktionen des CD40/CD40L-Systems in der B-Zell-Entwicklung. So stellt dieses System einen der wichtigsten kostimulatorischen Faktoren in der Aktivierung naiver B-Zellen dar. Das initiale Signal für eine Aktivierung ist ein Antigenkontakt und daraus resultierendes B-Zell-Rezeptor-Signalling. Nach zusätzlichen Signalen über kostimulatorische Moleküle, zu denen auch CD40L zählt, beginnt die B-Zelle Adhäsionsmoleküle [245, 246], zusätzliche kostimulatorische Faktoren wie CD80 und CD86 sowie vermehrt MHCII Moleküle auf der Zelloberfläche zu exprimieren [247]. Somit wird die naive

B-Zelle zur professionell antigenpräsentierenden Zelle. Diese Zellen sind nun in der Lage kostimulatorische Zytokine zu sezernieren. So ist berichtet, dass CD40L stimulierte B-Zellen in der Lage sind IL-6 und IL-10 zu bilden, welche beide eine wichtige Rolle in der weiteren Differenzierung von B-Zellen haben [248, 249].

Ein weiterer Aspekt der CD40L Wirkung in der B-Zell-Differenzierung ist die Ausbildung und Aufrechterhaltung von germinalen Zentren in sekundären lymphatischen Organen. Eine T-Helferzelle muss hierbei auf eine antigenpräsentierende Zelle treffen, um von dieser aktiviert werden zu können. Die nun aktivierte T-Zelle ist wiederum in der Lage B-Zellen zur Proliferation zu stimulieren (siehe Abbildung 7). Es konnte gezeigt werden, dass eine CD40/CD40L-Interaktion sowohl initiales Proliferationssignal als auch später Überlebenssignal für B-Zellen zur Aufrechterhaltung der daraufhin gebildeten Strukturen, den germinalen Zentren ist [173, 250].

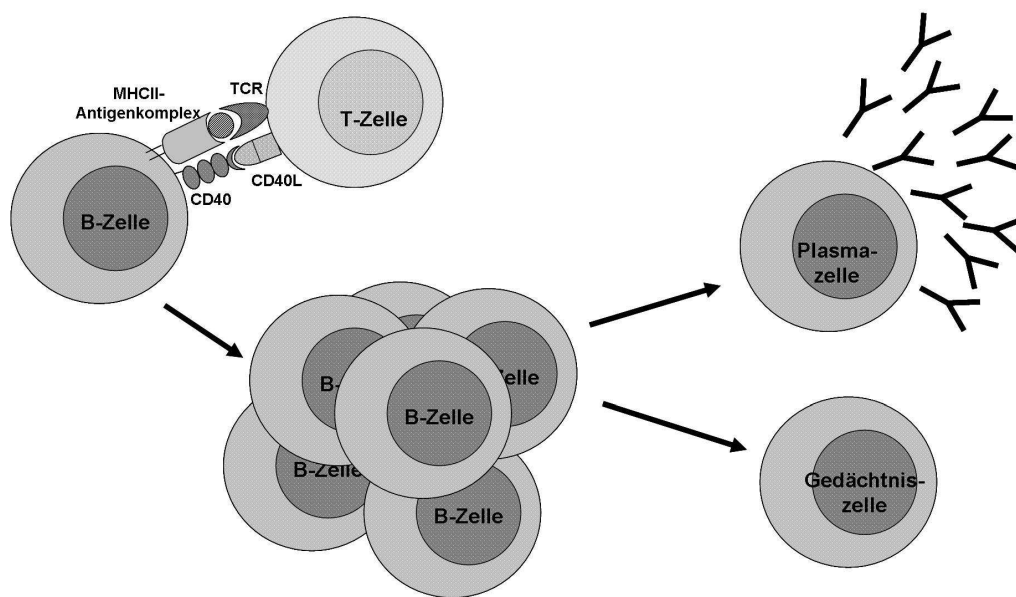


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aktivierung von B-Zellen

Im germinalen Zentrum, vollzieht sich nun die Affinitätsreifung des B-Zell-Rezeptors sowie der Immunglobulinklassenwechsel. Die Affinitätsreifung von Antikörpern wird durch den Mechanismus der somatischen Hypermutation vermittelt, wobei hauptsächlich Punktmutationen ins entsprechende Gen eingeführt werden. CD40L Stimulation führt *in vitro* zusammen mit IL-4 zur Zunahme des für diesen Mechanismus wichtigen Enzyms Aktivierungs-induzierte-Deaminase (AID) [251, 252]. Ebenso essentiell ist die Stimulation durch CD40L für den Immunglobulinklassenwechsel bei T-Zell abhängigen Immunantworten. Auch in diesem Mechanismus spielt das Enzym AID eine wichtige Rolle [253]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass CD40-Stimulation

einen Klassenwechsel zu IgG und IgA bewirken kann [254], die Induktion eines Klassenwechsels zu IgE war zusammen mit IL-4 möglich [255]. Patienten mit X-chromosomal rezessiv vererbtem Hyper-IgM-Syndrom weisen einen Defekt im CD40L Gen auf. Ihnen fehlt die Fähigkeit zum Klassenwechsel. Es konnte aber gezeigt werden, dass B-Zellen dieser Patienten in Kultur durch die Zugabe von CD40L und weiteren Zytokinen zum Klassenwechsel getrieben werden konnten [256].

2.2.2.2 Das CD40/CD40L-System in der B-Zell-Entwicklung des Huhns

Struktur

Beim Haushuhn wurde das chCD40L-Molekül erstmals von Tregaskes et al. beschrieben [175]. Hierfür wurde eine Datenbankrecherche nach homologen Sequenzen für den humanen CD40L durchgeführt. Mit einem daraufhin klonierten chCD40L-Fusionsprotein, welches die mit einem Maus-CD8-Tag versehene extrazelluläre Domäne von chCD40L umfasst, wurde eine Ligandensuche in einer in HD11-Zellen exprimierten cDNA-Bibliothek durchgeführt. Hierbei konnte auch die Sequenz für chCD40 identifiziert werden [174]. Mittlerweile konnte auch bei der Ente ein homologes Gen identifiziert und kloniert werden [257].

Expression

Gegen das chCD40L-Fusionsprotein wurde ein monoklonaler Antikörper entwickelt, welcher dann zur Detektion von membranständigem chCD40L verwendet wurde. ChCD40L konnte auf der Oberfläche von PMA (Phorbol Myristat Acetat) stimulierten CD4 und CD8-positiven T-Zellen gefunden werden. Frisch isolierte, unstimulierte T-Zellen zeigten keine Expression [175]. Der zugehörige Rezeptor wurde auf B-Zellen aus Bursa fabricii, Milz und Blut gefunden, also unreifen und reifen B-Zellen. Darüberhinaus konnte das Molekül auch auf Monozyten und Makrophagen sowie in geringerem Maße auf Thrombozyten gefunden [174, 175].

Funktionen

Bisher wurden beim Huhn nur *in vitro*-Versuche zur Funktion des CD40/CD40L-Systems durchgeführt. Diese erfolgten mit Hilfe des von Tregaskes et al.

rekombinant hergestellten chCD40L-Fusionsproteins. Dieses Molekül erhöhte in Kultur die Rate der lebenden B-Zellen nach 48 bzw. 120 Stunden ca. auf das vierfache [174, 175]. In $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Assays konnte gezeigt werden, dass dies nicht auf eine Verringerung der Apoptoserate, sondern auf eine Zellproliferation zurückzuführen war. Dieses System ermöglichte nun erstmals die Kultur von Hühner-B-Zellen über einen Zeitraum von bis zu drei Wochen. Eine Zunahme der MHCII Oberflächenexpression weist auf eine Aktivierung der B-Zellen hin. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass mit chCD40L kultivierte B-Zellen im Laufe von 12 Tagen an Größe und Granularität zunahm und somit eher dem Phänotyp von Lymphoblasten entsprachen. Weitere Anzeichen für eine phänotypische Veränderung in Richtung Plasmazellen waren sowohl die binnen zwei Tagen herunter regulierte Expression des B-Zell-spezifischen Oberflächenmarkers Bu1 als auch eine Zunahme der Produktion von IgM und IgG [174]. Wie auch bei humanen B-Zellen im Rahmen der germinalen Zentrumsreaktion berichtet [248, 249], produzierten chCD40L stimulierte Hühner-B-Zellen IL-6, was ein weiteres Charakteristikum der fortschreitenden Differenzierung darstellt.

Interessanterweise wurde um 1980 mehrfach von einer Hühnerlinie berichtet, deren Tiere erhöhte IgM-Spiegel, jedoch kaum IgG aufwiesen, also ähnliche Symptome wie Menschen mit X-chromosomal rezessiv vererbtem Hyper-IgM-Syndrom zeigten [258, 259]. Da damals kaum Kenntnisse über den Einfluss von Zytokinen auf die B-Zell-Entwicklung vorlagen, konnte das Syndrom in dieser Hinsicht nicht näher charakterisiert werden. Vom heutigen Standpunkt aus, läge aber sicherlich die Vermutung nahe, dass diese Tiere einen Defekt im CD40/CD40L-System aufweisen und dass somit immundefiziente Tiere auch in kommerziellen Linien vorkommen können.

3 Zielsetzung der Arbeit

Um Aufschluss über die Funktion von Zytokinen beim Haushuhn zu erhalten, müssen *in vitro*-Ergebnisse in letzter Konsequenz immer *in vivo* überprüft werden. Bisher wurden hier vorwiegend Untersuchungen durchgeführt, bei denen Tieren rekombinant hergestelltes Protein verabreicht wurde. Da die Herstellung rekombinanten Proteins jedoch teuer und aufwändig ist, sind diese Studien nur *in ovo* oder bei Küken in den ersten Lebenstagen durchführbar.

Als weiterer Ansatz sind Transgen- bzw. Knockout-Technologien denkbar. Die Erstellung Keimbahn-transgener Hühner ist mittlerweile möglich, wie jedoch die Literatur zeigt, immer noch relativ ineffizient. Die Generierung proteinexprimierender Tiere dauert verhältnismäßig lange. Knockouts sind bisher nur effizient im Mausmodell generierbar.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Technologie zu etablieren, die eine schnelle und zuverlässige Generierung proteinexprimierender Tiere ermöglicht und so die Durchführung funktionell-genomischer Studien am Huhn vereinfacht. Bisherige Arbeiten mit dem RCAS-System beschränkten sich auf entwicklungsbiologische Fragestellungen am Hühnerembryo und Küken in den ersten Lebenstagen. Nun sollte die RCAS-Gentransfertechnologie erstmals für den Einsatz zur Untersuchung von Zytokinfunktionen nach dem Schlupf bis hin zum jung adulten Alter der Tiere etabliert und charakterisiert werden.

Nach erfolgreicher Etablierung der Technik sollte abschließend das CD40/CD40L-System beim Haushuhn näher untersucht werden. Über dieses Rezeptor-Ligand-System liegen bereits *in vitro*-Arbeiten vor, die eine Rolle des Systems in der B-Zell-Differenzierung nahe legen. Mit der Etablierung der Vektoren sollte eine Grundlage für weitere, detailliertere *in vivo*-Untersuchungen geschaffen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Tiere und Tierhaltung

Für *in vitro*-Versuche wurden Blut und Organe von Hühnern der Linien M11 ($B^{2/2}$ -Haplotyp), LSL (*Lohmann's selected Leghorn*) und Linie „0“ (*Compton subline*) gewonnen. Die Eier der Linie M11 stammten vom Institut für Tierzucht in Mariensee, LSL-Eier sowie -Tiere wurden von der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven zur Verfügung gestellt. Linie „0“ Eier wurden vom Institute for Animal Health in Compton, UK geliefert. Die *in vivo*-Versuche mit Hühnern der Linien LSL und „0“ wurden von der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 209.1/211-2531-46/03 genehmigt. Eier wurden im Institut für Tierphysiologie unter Standardbedingungen ausgebrütet und die Tiere anschließend in Gruppen in Gitterrostkäfigen und Volieren gehalten. Es wurde handelsübliches Alleinfutter gefüttert, Wasser stand ad libitum zur Verfügung. RCAS(BP)A-transduzierte Tiere und unbehandelte Kontrollen wurden in separaten Käfigen gehalten.

4.2 Zellen und Zellkultur

4.2.1 Gewinnung von primären Hühnerzellen

4.2.1.1 Material

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle im Folgenden genannten Medien und Zusätze bei 4°C gelagert. Die Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang aufgeführten Bezugsquellen.

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2

8,0 g Natriumchlorid (NaCl)¹
1,45 g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na₂HPO₄·2H₂O)¹
0,2 g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)¹
0,2 g Kaliumchlorid (KCl)¹
ad 1000 ml Aqua dest.

Einstellung des pH-Werts mit HCl bzw. NaOH auf 7,2, für die Verwendung in der Zellkultur autoklaviert

Ficoll-Paque²

Heparinlösung (500 U/ml)

1 ml Heparin-Natrium 20.000³
ad 40 ml RPMI 1640 mit 0,532 g/l stabilem Glutamin⁴
(im Folgenden RPMI)

Trypanblau-Lösung²**1x Trypsin-EDTA**

10 ml 10x Trypsin-EDTA Lösung²
ad 100 ml Aqua bidest.

4.2.1.2 Gewinnung von Blutleukozyten

Den Tieren wurde zur Gewinnung von mononukleären Blutleukozyten mit einer heparinisierten Spritze Blut aus der rechten Vena jugularis entnommen. Volumina bis zu 2 ml wurden 1:2 mit PBS verdünnt, größere Mengen wurden unverdünnt gelassen. Danach wurde das Blut bzw. Blutgemisch über das gleiche Volumen Ficoll-Paque-Lösung geschichtet. Nach 12-minütiger Dichtegradienten-Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 600xg wurde ggf. zunächst das Plasma und danach die in der Interphase befindlichen Leukozyten mit einer Pipette abgenommen und zweimal mit gekühltem PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde nach einer Trypanblau-Färbung mikroskopisch bestimmt.

4.2.1.3 Gewinnung von Leukozyten aus Organen

Zur Organentnahme wurden die Hühner betäubt und durch Blutentzug getötet. Die Milz wurde sofort nach der Entnahme in 4°C kaltes steriles PBS überführt und auf Eis gestellt. Zur weiteren Präparation wurden die Organe mechanisch zerkleinert. Größere Milzen wurden mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein in PBS stehendes Metallsieb (Maschenweite 0,75 x 0,75 mm) gedrückt, kleine Milzen und Thymi wurden mit Hilfe einer 1 ml Spritze durch mehrmaliges aufziehen und ausdrücken zerkleinert. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden in entsprechende Röhrchen überführt, mit kaltem PBS aufgefüllt und zur Sedimentation von größeren Gewebestücken für ca. 10 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde der Überstand abgenommen, bei 4°C und 225xg für 10 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und auf 10 ml einer Ficoll-Paque-Lösung geschichtet. Nach 12-minütiger Dichtegradienten-Zentrifugation konnten die Leukozyten aus der Interphase abgenommen werden.

Knochenmark wurde durch Spülung von Femura mit PBS gewonnen. Die gewonnene Zellsuspension wurde für 10 Minuten zur Sedimentation auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, bei 4°C und 225xg für 10 Minuten zentrifugiert und die Zellen wurden in PBS resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde ohne Dichtegradienten-Zentrifugation für durchflusszytometrische Messungen verwendet.

4.2.1.4 Gewinnung von primären Hühnerembryofibroblasten (HEF)

HEF wurden aus Linie „0“ sowie LSL-Embryonen gewonnen. Für *in vitro*-Versuche zur Infizierbarkeit verschiedener Hühnerlinien stellte die Firma Lohmann Tierzucht spezielle Eier der Linie LSL zur Verfügung, deren genetischer Hintergrund auf verschiedene Großelterntiere zurückverfolgt werden kann. Diese werden in dieser Arbeit mit LSL A und LSL C bezeichnet.

Hühnerembryonen wurden am 10. Tag der Bebrütung durch Dekapitation getötet. Die Torsi wurden nach Abtrennen der Gliedmaßen in ein Becherglas mit ca. 2 ml PBS gegeben und mechanisch zerkleinert. Bei der Herstellung größerer Chargen von Zellen wurden mehrere Embryonen zusammen mit 20 ml 1x Trypsinlösung in einem größerem Kolben in einem Wasserbad bei 37°C unter rühren für 20 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde in 50 ml Röhrchen überführt, die restlichen Gewebeteile weiter bei 37°C mit Trypsin verdaut. Der abgenommene Überstand wurde zur erneuten Sedimentation für 10 Minuten auf Eis gestellt. Der hieraus resultierende Überstand wurde nun abzentrifugiert (225xg, 10 Minuten, 4°C). Die pelletierten Zellen wurden mit Medium auf die gewünschte Dichte eingestellt und in Kultur genommen.

4.2.2 Zellkultur

4.2.2.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Standardmedium (10% FCS)

445 ml RPMI 1640⁴

50 ml fetales Kälberserum (fetal calf serum (FCS), 30 Minuten bei 5°C inaktiviert)²

5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung²
(100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)

FCS und Penicillin-Streptomycin wurden in Aliquots bei -20°C gelagert.

HD11-Medium

445 ml RPMI⁴
 40 ml FCS²
 10 ml Hühnerserum⁴
 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung²

HEF-Medium

445 ml Basal ISCOVE²
 25 ml FCS²
 10 ml Hühnerserum⁴
 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung²

PBS-EDTA-Lösung

200 mg Ethylendiamintetraacetic Acid Tetra-Natrium Hydrat (EDTA)⁵
 ad 1000 ml PBS

G418-Stammlösung 50mg/ml

250 mg G418⁵
 ad 5 ml PBS

Standard-Einfriermedium

45 ml FCS²
 5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)¹

HEF-Einfriermedium

35 ml RPMI⁴
 10 ml FCS²
 5 ml DMSO¹

Lagerung: DMSO wurde bei RT gelagert, das Einfriermedium bei -20°C

4.2.2.2 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Spezies	Medium	Referenz
293-T	Nierenfibroblasten	Mensch	Standardmedium	[260]
HD11	Myeloide Zellen	Huhn	HD11-Medium	[261]

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

4.2.2.3 Kultivierung von Zellen

Bei adhären wachsenden 293-T und HD11 Zellen wurde zur Teilung das Medium vollständig abgenommen und der Zell-Monolayer zur Entfernung von FCS Resten einmal kurz mit 37°C warmem PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit PBS-EDTA-Lösung (37°C) bedeckt und ca. 10 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS gewaschen, in der gewünschten Dichte in entsprechendem Medium aufgenommen und bei 37°C bzw. 40°C weiterkultiviert.

Adhärenent wachsende Hühnerembryofibroblasten wurden zur Teilung ebenfalls kurz mit warmem PBS gespült und bei 40°C mit 1x Trypsin-Lösung inkubiert. Nach ca. 4 Minuten wurde das Trypsin mit HEF-Medium neutralisiert, die Zellen wurden in der gewünschten Dichte eingestellt und bei 40°C weiterkultiviert.

4.2.2.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen pelletiert und in einer Dichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml in kaltem Einfriermedium eingestellt. Je 1,8 ml der Zellsuspension wurden in entsprechende Gefrier Röhrchen überführt und über Nacht in einer Isopropanol haltigen Einfrierbox (Abkühlung 1°C/Minute) bei –80°C eingefroren. Für eine vorübergehende Lagerung von einigen Monaten verblieben die Zellen bei –80°C, für eine längere Lagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

4.2.2.5 Auftauen von Zellen

Die gefrorene Zellsuspension wurde möglichst rasch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zügig in ein 50 ml Röhrchen überführt. Dann wurde 50 ml kaltes RPMI möglichst langsam zugegeben, um zellschädliches DMSO langsam auszuwaschen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (225xg, 10 Minuten, 4°C) und nochmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in Medium resuspendiert und in Kultur genommen.

4.2.2.6 Proliferations-Inhibitions-Assay

Zum *in vitro*-Nachweis der spezifischen Bindung von chCD40-huFc an seinen Liganden, wurde versucht die Proliferation von Milz-B-Zellen nach Stimulation mit chCD40L-Fusionsprotein zu inhibieren. Hierzu wurde das chCD40L-Fusionsprotein mit chCD40-huFc-haltigen Zellkulturüberstand für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Material

³[H]-Thymidin⁶

chCD40L-Fusionsprotein [175]

Durchführung

Auf eine sterile 96-Loch-Flachbodenplatte wurden pro Kavität jeweils 100 µl einer Milzzellsuspension pipettiert, welche zuvor mit B-Zell-Medium auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt wurde. Zu den Zellen wurde nun chCD40L-Fusionsprotein gegeben, welches in einer Konzentration von 1 µg/ml in chCD40-huFc-haltigem 293-T Zellkulturüberstand gelöst war. Als Positivkontrolle diente in RPMI gelöstes chCD40L-Fusionsprotein, als Negativkontrolle wurde Medium eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen mit 20 µl einer ^3H -Thymidinlösung (entspricht 0,5 µCi/ml) gepulst. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellkulturplatten bis zum Auslesen bei -20°C gelagert. Die Radioaktivität der Zellen auf Grund des eingebauten ^3H -Thymidins wurde mit Hilfe eines Szintillationsmessers (TopCount, Firma PerkinElmer) gemessen.

4.3 Vektoren und Klonierung

4.3.1 Verwendete Konstrukte

Laborinterne Konstrukte-Nr.	Insert	Vektor	Klonierungs-enzyme	Resistenz
K023		RCAS (BP) A		Amp
K017		pEGFP-N1		Kan/Neo
K051	eGFP	RCAS (BP) A	<i>Cla</i> I (beidseits)	Amp
K031	GFP	RCAS (BP) A	<i>Cla</i> I (beidseits)	Amp
K029	chCD40	pcneo		Amp
K048	Fas	pCR-3-huFc		Amp/Neo
K063	chCD40	pCR-3-huFc	<i>Hind</i> III / <i>Bam</i> HI	Amp/Neo
K065	chCD40-huFc	RCAS (BP) A	<i>Cla</i> I (beidseits)	Amp
K025	chBAFF-Flag	RCAS (BP) A	<i>Cla</i> I (beidseits)	Amp
K026	chBAFF-Flag rv	RCAS (BP) A	<i>Cla</i> I (beidseits)	Amp
K027	huBCMA-huFc	RCAS (BP) A	<i>Cla</i> I (beidseits)	Amp

Tabelle 4: Verwendete Konstrukte

Die Konstrukte K025, K026, K027 und K031 wurden von Frau Dr. Sonja Kothlow kloniert und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Konstrukte K051, K063 und K065 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Der Ablauf der einzelnen Klonierungen ist im Folgenden kurz dargestellt, die genauen Methoden folgen in den nächsten Punkten dieses Kapitels.

Klonierung von eGFP in RCAS(BP)A

Das Ausgangsplasmid für die Klonierung von eGFP in RCAS(BP)A war der Vektor pEGFP-N1. Die Zielsequenz wurde mittels PCR mit einer *proof reading* Polymerase amplifiziert, was die Genauigkeit der PCR erhöht. Es wurden hierbei spezifische Primer verwendet, welche an das Insert beiderseits eine *ClaI* Schnittstelle anfügten (siehe 4.3.2). Die Länge des erhaltenen Amplifikats wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Das Amplifikat wurde mit dem Restriktionsenzym *ClaI* verdaut und anschließend aufgereinigt. Ebenso wurde der RCAS(BP)A-Vektor mit *ClaI* verdaut und über ein präparatives Gel aufgereinigt. Der gereinigte Vektor wurde mit einer Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert.

Vektor und Insert wurden mit einer T4-Ligase zusammengefügt. Das so erhaltene Plasmid wurde in den *E. coli* Stamm JM 109 transformiert. Diese Bakterien wurden auf einer Agarplatte ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien von der Platte gepickt und nach kurzer Bebrütung in LB-Medium (siehe 4.3.9) per PCR mit Primern getestet, welche am RCAS(BP)A-Vektor kurz vor bzw. nach der Insertionsstelle binden. Als Positivkontrolle wurde das Konstrukt RCAS(BP)A-BAFF-Flag eingesetzt.

Klonierung von chCD40-huFc in pRC3

Um die Sequenz von löslichem chCD40 an die Sequenz des humanen Fc-Teils anfügen zu können, wurde aus einem Konstrukt (im Expressionsvektor pCR3), das für ein humanes Fas-Fc-Fusionsprotein kodiert, die Sequenz für Fas durch jene für das lösliche chCD40-Protein ersetzt. Hierzu wurden zunächst 16 µg Plasmid in vier Ansätzen mit den Enzymen *BamHI* und *HindIII* wie angegeben verdaut und über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Die Banden der einzelnen Ansätze wurden mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Kit NucleoSpin® Extract II⁷ aufgereinigt. Die erhaltene DNA wurde dephosphoryliert. Die Sequenz für lösliches chCD40 wurde per PCR amplifiziert. Hierzu wurden Primer entworfen, welche die gewünschten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *HindIII* anfügen (siehe Tabelle 5). Das erhaltene PCR-Produkt wurde aufgereinigt und anschließend mit den genannten Enzymen verdaut.

Im nächsten Schritt erfolgte die Ligation von pCR3-huFc und dem löslichen chCD40 mittels einer T4-Ligase in den Verhältnissen den 1:5 und 1:3 (Vektor zu Insert). Das Produkt der Ligrationsreaktion wurde in *E. coli* des Stamms JM109 transformiert, diese wurden auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurden erhaltene Einzelkolonien von der Platte gepickt, in LB-Medium (mit Ampicillin) für 3 Stunden bebrütet und per PCR getestet. Die erhaltenen positiven Klone wurden über Nacht in 6 ml Medium bebrütet. Am nächsten Morgen wurde, nach Einfrieren eines Bakterienstocks, Plasmid präpariert. Um sicherzugehen, dass das Insert integriert wurde, schloss sich an dieser Stelle ein diagnostischer Verdau von 300 ng des präparierten Plasmids an. Dieser wurde mit den Enzymen *HindIII* und *PvuII* durchgeführt. An Hand der Fragmentlängen konnte der die Integration des Inserts bestätigt werden.

Klonierung von chCD40-huFc in RCAS(BP)A

Das Konstrukt pCR3-chCD40-huFC diente nunmehr als Basis für eine Klonierung von chCD40-huFc in RCAS(BP)A (siehe Abbildung 44).

Hierfür wurde die Sequenz von chCD40-huFc in einer PCR amplifiziert. Die Primer wurden so entworfen, dass die für die Ligation in RCAS(BP)A notwendigen *ClaI* Schnittstellen mit angefügt wurden (siehe Tabelle 5). Als passende Temperatur für das Annealing wurden 60°C ermittelt, die Elongationszeit für das 1290 bp große Amplifikat waren 75 Sekunden. Anschließend wurde der Erfolg der PCR-Reaktion in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft und das Amplifikat mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits⁷ aufgereinigt.

Parallel dazu wurde auch der RCAS(BP)A-Vektor mit *ClaI* verdaut und über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Der aufgereinigte Vektor wurde wiederum mit einer Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert.

Vektor und Insert wurden nun in den Verhältnissen 1:5 und 1:8 ligiert. Diese Verhältnisse stellten sich für den RCAS(BP)A-Vektor als optimal heraus. Das Produkt der Ligation wurde wiederum in Bakterien des Stamms JM109 transformiert, welche auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten über Nacht bebrütet wurden. Am Tag darauf wurden Einzelkolonien gepickt, erneut bebrütet und per

PCR auf Integration des Vektors überprüft. Aus positiven Klonen wurde, nach Einfrieren eines Stocks, mit dem Wizard® Plus Miniprep Kit⁸ Plasmid präpariert. Da das Insert über nur eine Schnittstelle in den RCAS(BP)A-Vektor eingefügt worden war, musste nun eine Überprüfung der Orientierung des Inserts erfolgen. Hierfür wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen *BglI* und *StuI* durchgeführt, bei welchem vier Fragmente entstehen. Die *BglI*-Schnittstelle im Insert liegt jedoch so, dass sich die Länge des Fragments bei richtiger und falscher Orientierung um ca. 1000 Basenpaare unterscheiden.

4.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ermöglicht die Amplifizierung von DNA-Stücken an Hand einer DNA-Matrize. Als Matrize diente hier das Ausgangsplasmid. Über spezifische Primer wurden die gewünschten Enzymschnittstellen an das Amplifikat angefügt, so dass die Stücke nach Enzymverdau in andere Vektoren ligiert werden konnten. Zur Klonierung wurde eine Polymerase mit sog. *proof reading* Aktivität (Pfu-Polymerase) verwendet, was die Fehlerhäufigkeit bei der Amplifizierung der DNA-Stücke vermindert.

Material

10x Puffer mit MgSO₄⁸

Pfu Polymerase⁸

dNTPs⁹

Aqua bidest. (nucleasefrei)

Primer

Die Primer wurden an Hand des Programms *Perl Primer* erstellt.

Die Synthese erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

Ziel-sequenz	Primer-Nr.	Sequenz (5'→ 3')	Verwendung
eGFP	07013 sense	GCTGA atcgat ATGGTGAGCAAGG	Anfügen einer <i>ClaI</i> -Schnittstelle Klonierung in RCAS(BP)A
eGFP	07014 antisense	CTCGACATGTCATT tagcta GATCG	Anfügen einer <i>ClaI</i> -Schnittstelle Klonierung in RCAS(BP)A
chCD40	07031 sense	AT aagt ATGGGGCGGCTCGGGCTGCTGGGA	Anfügen einer <i>HindIII</i> -Schnittstelle Klonierung in pCR-3-huFc
chCD40	1027 antisense	TCGGCCGCGAGTAGCGAC cctagg TA	Anfügen einer <i>BamHI</i> -Schnittstelle Klonierung in pCR-3-huFc
chCD40-huFc	07015 sense	GAATG atcgat ATGGGGCGGCTCG	Anfügen einer <i>ClaI</i> -Schnittstelle Klonierung in RCAS(BP)A
chCD40-huFc	07016 antisense	CAGAGGCCCATTTACT tagcta GATCG	Anfügen einer <i>ClaI</i> -Schnittstelle Klonierung in RCAS(BP)A

Tabelle 5: In der Klonierung verwendete Primer

Die Sequenzen der Enzymschnittstellen sind in Kleinbuchstaben dargestellt.

Durchführung

Ansatz für eine PCR-Reaktion

10x Puffer mit MgSO ₄	5 µl
dNTPs (jeweils 200 µM)	5 µl
Primer sense (10 pM)	10 µl
Primer antisense (10 pM)	10 µl
H ₂ O (nucleasefrei)	variabel
DNA-Template (1 ng)	variabel
Pfu-Polymerase	
(1,25 Units)	0,5 µl
gesamt	50 µl

Für die PCR wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen gewählt.

Es wurden 35 Zyklen durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	1 bis 35
Annealing	primerspezifisch	30 sec	1 bis 35
Elongation	70 – 75 °C	2-4 min, je nach Länge des Amplifikats	1-35
Finale Elongation	70 – 75°C	5 min	35

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die PCR

4.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Länge. Auf Grund einer konstant angelegten Spannung wandern die geladenen Stücke durch das Gel und können danach mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Material

5x TBE-Puffer

54 g TRIS¹
 27,5 g Borsäure¹⁰
 20 ml 0,5M EDTA⁵, pH8
 ad 1000 ml Aqua dest.

0,5x TBE-Puffer

1:10 Verdünnung des 5x Stocks mit Aqua dest.

6x Loading Dye (Ladepuffer)⁹

DNA-Ladder-Mix (Marker)⁹

Ethidiumbromid Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid⁵

ad 1 ml Aqua dest., Lagerung bei 4°C

Vor Gebrauch wurde die Lösung 1: 1000 mit Aqua dest. verdünnt.

Durchführung

Die in 0,5x TBE-Puffer in einer Konzentration von 1% angesetzte Agarose wurde im Mikrowellenherd erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde sie in die Gießvorrichtung mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach ca. 30 Minuten konnte das Gel in die Gelkammer überführt werden und dort mit dem Laufpuffer (0,5x TBE) überschichtet werden. Die Proben wurden mit dem Ladepuffer gemischt (5 Teile Probe + 1 Teil Puffer) und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Referenz wurde in eine Tasche Marker (DNA-Ladder-Mix) gegeben, der verschiedene DNA-Fragmente definierter Längen enthält. Auf das Anlegen einer konstanten Spannung von 100 bis 120 V wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente im Gel in Richtung der Kathode. Nach einer Zeit von 25 bis 30 Minuten wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung überführt. Die aufgetrennten Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert. Bei einem präparativen Gel zur Aufreinigung von DNA wurden die entsprechenden Banden auf einem UV-Schirm mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

4.3.4 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA nach Restriktionsenzymverdau, aus ausgeschnittenen Banden sowie die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des Kits NucleoSpin® Extract II⁷ nach Herstellerangaben.

4.3.5 Restriktionsenzymverdau von Vektor und Insert

Nachdem die Inserts in der PCR amplifiziert und mit den passenden Schnittstellen versehen worden waren, wurden sie ebenso wie die Vektoren mit Restriktionsenzymen verdaut. Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die verschiedenen Enzyme zu gewährleisten, wurde der vom Hersteller für das gewählte Enzym oder die gewünschte Enzymkombination empfohlene Puffer verwendet.

Material**Restriktionsenzyme⁹****Puffer zu Restriktionsenzymen⁹****Aqua dest., nucleasefrei**

Die angegebenen Reagenzien wurden bei -20°C gelagert.

Durchführung**Ansatz für eine Reaktion**

Plasmid (4µg)	variabel
Puffer (10x)	2 µl
Enzym 1	0,5 µl
Evtl. Enzym 2	0,5 µl
ad 20 ml Aqua dest. (nucleasefrei)	

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Ansätze 3 Stunden in einem Thermoschüttler bei 37°C und 600 rpm inkubiert und die Enzyme danach bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inaktiviert. PCR amplifizierte Inserts wurden nach dem Verdau mit Hilfe des oben genannten Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Vektoren wurden auf Grund ihrer Größe über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt.

4.3.6 Dephosphorylierung des Vektors

Um freie DNA-Enden für eine Ligation zu erhalten, wurde der verdaute Vektor mit einer Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert.

Material**Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)⁹****CIAP Puffer⁹****Aqua dest., nucleasefrei**

Die angegebenen Reagenzien wurden bei -20°C gelagert.

Durchführung**Ansatz**

Vektor	10-40 µl
(verdaut und aufgereinigt)	
10x CIAP Puffer	5 µl
ad 49 µl Aqua dest., nucleasefrei	
CIAP	1 µl

Zunächst wurden Vektor-DNA, Puffer und Wasser vermischt und danach die Phosphatase zugegeben. Nach einer Inkubation bei 37°C und 600 rpm für 30 Minuten auf einem Thermoblock wurde das Enzym für 15 Minuten bei 85°C inaktiviert.

4.3.7 Ligation von Insert und Vektor

Bei der Ligationsreaktion werden Vektor und Insert entsprechend ihres Molekulargewichts und in einem bestimmten Verhältnis zueinander (siehe unten) mit der Ligase inkubiert. Diese verbindet die dephosphorylierten DNA-Enden des Vektors mit dem Insert.

Material

T4 Ligase⁹

10x T4 Ligasepuffer⁹

Aqua dest., nucleasefrei

Alle aufgeführten Reagenzien wurden bei -20°C gelagert.

Durchführung

Die Ligationsreaktion wurde mittels einer vereinfachten Gleichung wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Eingesetzte Menge an Vektor}}{\text{bp Vektor}} = \frac{x}{\text{bp Insert}}$$

Hierbei entspricht x der einfachen eingesetzten Menge an Insert. Bei der Klonierung in pCR-3 wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 (Menge an Insert = 3x) und 1:5 (Menge an Insert = 5x) eingesetzt. Im Gegensatz dazu wurden bei der Klonierung in RCAS(BP)A die Verhältnisse 1:5 und 1:8 (Menge an Insert = 8x) verwendet.

Ansatz

Vektor (100 ng)	variabel
Insert	variabel
10x Ligasepuffer	2 µl
ad 20 µl Aqua dest.	
T4 Ligase	1 µl

Zusätzlich zur eigentlichen Ligationsreaktion wurde ein Kontrollansatz durchgeführt, in den nur Vektor-DNA gegeben wurde. Bei erfolgreicher Dephosphorylierung verbinden sich beide Enden in diesem Fall nicht miteinander. Die Reaktionsgemische wurden bei Ligation in pCR-3 für eine Stunde, bei Ligation in RCAS(BP)A für 8 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung der Ligase wurde das Reaktionsgemisch anschließend für 20 Minuten bei 65°C inkubiert.

4.3.8 Transformation von Bakterien

Die neu erstellten Plasmide wurden in chemisch kompetente Bakterien des E. coli-Stamms JM109 transformiert.

Material

Chemisch kompetente Bakterien des Stamms JM 109

Lagerung bei -80°C

SOC Medium

5,1 g SOB Pulvermedium¹

150 ml Aqua bidest.

2 ml KCl¹ zugeben (250mM)

Einstellen auf pH 7,0

ad 200 ml Aqua bisdest., Autoklavieren der Lösung

1 ml MgCl₂¹-Lösung (2M, steril filtriert)

4 ml Glucose¹-Lösung (1M, steril filtriert)

LB-Agar-Platten

Soweit nicht anders vermerkt, wurde dem noch flüssigen Agar (Temperatur < 60°C) Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Durchführung der Transformation

Die Bakterien wurden für 5 Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10 µl der Ligationsreaktion zugegeben. Da die Zellwand der Bakterien auf Grund chemischer Behandlung äußerst instabil ist, wurde die Suspension nicht durch auf und ab Pipettieren, sondern durch vorsichtiges Rühren vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten (auf Eis) wurden die Bakterien in einem auf 42°C erwärmtem Wasserbad für 50 Sekunden hitzegeschockt und sofort danach wieder auf Eis gestellt. Zur Bakteriensuspension wurden nun 900 µl SOC-Medium gegeben. Es erfolgte eine einstündige Inkubation im Bakterienschüttler bei 37°C

und 200 rpm. Danach wurden die Bakterien bei 1000xg für 10 Minuten abzentrifugiert und in 200 µl SOC Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde nun vollständig auf einer LB-Agar-Platte verteilt, welche über Nacht bei 37°C bebrütet wurde.

4.3.9 Testung von Bakterienkolonien

4.3.9.1 Bakterien PCR

Material

Puffer B¹¹

MgCl₂¹¹

dNTPs⁹

Aqua bidest. (nucleasefrei)

Hot Start Taq Polymerase¹¹

Primer

Die Primer wurden an Hand des Programms *Perl Primer* erstellt. Die Synthese erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

Zielsequenz	Primer.-Nr.	Sequenz	Verwendung
chCD40	07031 sense	AT aagct ATGGGGCGGCTCGGGCTGCTGGGA	Erfolgskontrolle der Klonierung von chCD40 in pCR-3-huFc
chCD40	1027 antisense	TCGGCCGCGAGTAGCGAC cctagg TA	
RCAS(BP)A	07019 sense	GAGCAAGGCAGGAAAGACAG	Erfolgskontrolle der Klonierung von chCD40-huFc und eGFP in RCAS(BP)A
RCAS(BP)A	07020 antisense	CTAACCGCGTACAACCGAAG	

Tabelle 7: Primer zur Erfolgskontrolle der Ligation

Die Sequenzen der Enzymschnittstellen in Kleinbuchstaben dargestellt.

Durchführung

Ansatz für eine PCR-Reaktion

10x Puffer mit MgSO ₄	5 µl
dNTPs (jeweils 200 µM)	5 µl
Primer sense (10 pM)	10 µl
Primer antisense (10 pM)	10 µl
H ₂ O (nucleasefrei)	variabel
Bakteriensuspension	1 µl
HotStart Taq Polymerase	0,5 µl
Gesamt	50 µl

Zur Erfolgskontrolle der Ligation wurden von den bebrüteten Agarplatten mit einer Pipettenspitze Einzelkolonien gepickt und in 200 µl LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) für zwei Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert.

1 µl dieser Suspension wurde als PCR-Template eingesetzt. Es wurden hier Primer verwendet, welche an den Enden des Inserts bzw. kurz davor binden. Klone, die das Plasmid aufgenommen hatten, zeigten in der Agarose-Gelelektrophorese eine Bande entsprechend der Basenpaaranzahl des Inserts. Diese Klone wurden über Nacht in 6 ml LB-Medium mit Ampicillin vermehrt. Nach Herstellung eines Bakterienstocks (850 µl Bakteriensuspension + 150 µl Glycerol, Lagerung bei -80°C) wurde das Plasmid mit dem Wizard® Plus Miniprep Kit der Firma Promega nach Herstellerangaben präpariert.

4.3.9.2 Aufreinigung von Plasmid

Das Plasmid wurde mittels Wizard® Plus Miniprep Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und zur Überprüfung der Sequenz von der Fa. GATC, Konstanz sequenziert. Bei korrekter Sequenz wurde nochmals eine größere Menge an Plasmid präpariert.

Material

LB-Medium

25 g Lysogeny Broth (LB) Medium¹
ad 1000 ml Aqua dest.
Einstellung auf pH 7,2, sofort nach Herstellung autoklavieren
Lagerung bei 4°C

Ampicillin 50 mg/ml

500 mg Ampicillin¹⁰
ad 10 ml Aqua bidest.
Lagerung in 500 µl Aliquots bei -20°C

Wizard® Plus Miniprep Kit⁸

PureYield™ Plasmid Midiprep System⁸

Durchführung

Es wurden mit einer Plastik-Öse Kristalle des entsprechenden Bakterienstocks abgekratzt und damit 5 ml LB Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) beimpft. Die Reagenzröhrchen wurden für ca. 5 Stunden bei 37°C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurde die Kultur über Nacht in ein größeres Volumen LB-Ampicillin-Medium umgesetzt. Für *high copy* Plasmide, die in größerer Anzahl in den Bakterien vorkommen, wurden 50 ml kultiviert. Bakterien welche das *low copy* Plasmid RCAS(BP)A tragen, wurden in 150 ml inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Plasmid mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep

System nach Herstellerangaben präpariert und die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.3.9.3 Überprüfung der Orientierung

Da die Ligation in den RCAS(BP)A-Vektor über eine *Clal* Schnittstelle erfolgt, schloss sich an dieser Stelle die Überprüfung der Orientierung des Inserts an. Dies erfolgte entweder mittels diagnostischem Restriktionsenzymverdau oder mittels PCR. Bei der Überprüfung mittels Enzymverdau wurden zwei Schnittstellen ausgewählt, die das Plasmid in nur wenige Fragmente schneiden. Eine der beiden Schnittstellen musste im Insert liegen, durfte dieses jedoch nicht in der Mitte schneiden. So konnte in einer Agarose-Gelelektrophorese an Hand der Fragmentlängen die Orientierung der in den Vektor ligierten Sequenz ermittelt werden.

Eine Überprüfung mittels PCR konnte nur angewendet werden, wenn ein passendes Primerpaar mit nah zusammenliegenden Annealingtemperaturen zur Verfügung stand. Einer davon musste 5' der Insertionsstelle am Vektor binden, der andere am 3' Ende des Inserts. Bei richtiger Orientierung des Inserts, entstand ein Amplifikat, dessen Länge in etwa der des Inserts entspricht. Bei falscher Orientierung hingegen wies das Amplifikat nur eine Länge von wenigen Basenpaaren auf.

4.4 Transfektion von Zellen

4.4.1 Transfektion von 293-T Zellen

Material

RPMI 1640⁴

Metafectene®¹²

Durchführung

Am Tag vor der Transfektion wurden zu 90% konfluente 293-T Zellen in einer Dichte von $4,4 \times 10^6$ Zellen in einer Zellkulturschale ausgesät. Die Transfektionslösung wurde hergestellt, indem zunächst 15 µl Plasmid und 500 µl RPMI 1640 sowie 70 µl Metafectene und 430 µl RPMI in getrennten

Polypropylenröhrchen vermischt wurden. Diese beiden Lösungen wurden dann zusammen pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch es zur Bildung eines DNA-Lipid-Komplexes kommt. Schließlich wurde die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 48 Stunden Inkubation wurden Zellen oder Zellkulturüberstand analysiert. Für eine Transfektion in 24-Loch-Platten wurden die Volumina entsprechend angepasst.

4.4.2 Transfektion von primären Hühnerembryofibroblasten

Für die Transfektion von Hühnerembryofibroblasten wurden die auf RCAS(BP)A basierenden Plasmide verwendet.

Material

0,1x Tris EDTA-Puffer (TE)

1,21 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)¹
200 µl 0,5M EDTA-dinatriumhydrat (pH 8.0)
ad 1000 ml Aqua dest., Einstellung auf pH8

2x HEPES buffered saline (HBS)

1,6 g NaCl¹
74 mg KCl¹
27 mg Di-Natriumhydrogenphosphat¹
0,2 g Glucose¹
ad 80 ml Aqua dest.
5 ml HEPES (1M)¹
Einstellung auf pH 7,05

2M Calciumchlorid-Lösung

2,94 ml CaCl₂·2H₂O¹
ad 10 ml Aqua dest.

Die oben genannten Lösungen wurden nach dem Ansetzen steril filtriert und zu 500 µl aliquotiert bei -20°C gelagert.

HEF-Medium + 15% Glycerol

1,5 ml Glycerol (steril)¹
ad. 15 ml HEF Medium, Herstellung steril, Lagerung bei 4°C

Durchführung

Primäre Hühnerembryofibroblasten (HEF) der Linien „0“ oder LSL wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale ausgesät und über Nacht bei 40°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurde zunächst das Plasmid für die Transfektion vorbereitet. Es wurde mit sterilem 0,1x TE-Puffer auf ein

Gesamtvolumen von 230 µl pro Zellkulturschale in einer Konzentration von 40 µg/ml eingestellt und anschließend für 10 Minuten bei 16000xg zentrifugiert. Dies erfolgte, um eventuelle Verunreinigungen abzuzentrifugieren. 220 µl des Überstands wurden in ein 5 ml Röhrchen mit 250 µl HBS pipettiert und damit gemischt. Für die Transfektion ist die Bildung eines Komplexes aus Plasmid und Calciumchlorid notwendig. Da diese Komplexbildung begünstigt unter Luftzufuhr stattfindet, wurden mit einer automatischen Pipettierhilfe Luft in das Röhrchen geblasen und gleichzeitig 31 µl der Calciumchlorid-Lösung tropfenweise dazupipettiert. Das so hergestellte Plasmidgemisch wurde 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise auf die tags zuvor ausgesähten Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von vier Stunden bei 40°C wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit warmem PBS (siehe 4.2.1.1) gespült und mit 2 ml eines auf 37°C erwärmten Gemisches von HEF-Medium mit 15% Glycerol bedeckt. Da der hohe Glycerolgehalt einen Membranschock verursacht, wird die Zellmembran für den Komplex aus Calciumchlorid und Plasmid durchlässig. Nach einer Inkubation von 2 Minuten wurde die Medium-Glycerol-Mischung abgenommen, die Schale gründlich mit PBS gespült und mit frischem HEF-Medium gefüllt. Nach weiteren 48 Stunden in Kultur konnte der Erfolg der Transfektion überprüft werden.

Nachweis von RCAS(BP)A-basiertem Protein in HEF-Kulturen

Nach 48 Stunden in Kultur (40°C und 5% CO₂) konnte der Erfolg der Transfektion überprüft werden. Wie bereits erwähnt, entsteht bei einer Transfektion mit RCAS(BP)A vermehrungsfähiges Virus, daher wurden auch nicht transfizierte Zellen innerhalb dieser Zeit mit Virus infiziert und produzierten somit auch das entsprechende Protein. RCAS(BP)A-basiertes eGFP wurde, ebenso wie virales Protein p19, fluoreszenzmikroskopisch oder durchflusszytometrisch nachgewiesen. Lösliches Protein wurde in Zellkulturüberstand mittels ELISA nachgewiesen.

4.5 Infektion von Hühnerembryonen

4.5.1 Vorbereitung der Zellen

Transfizierte Zellen wurden über mehrere Passagen hinweg vermehrt, bis für eine

Injektion genügend Zellen zur Verfügung standen. Je Embryo werden 1×10^6 Zellen benötigt. In einer zu ca. 90% konfluenten Schale (Durchmesser 10 cm) befinden sich $7,5 \times 10^6$ bis 1×10^7 Zellen. Von diesen Zahlen ausgehend wurde damit gerechnet, dass mit einer Schale mindestens fünf Eier injiziert werden können, wobei Verluste durch Toträume in Spritzen und Kanülen berücksichtigt wurden. Zur Injektion wurden die Zellen in sterile 1 ml Spritzen aufgezogen, wobei hier zum Schutz der Zellen keine Kanüle verwendet wurde.

4.5.2 Injektion in embryonierte Eier

Die infizierten Zellen wurden nun in drei Tage bebrütete Eier injiziert. Hierzu wurde die Kalkschale am stumpfen Pol mit 70% Ethanol desinfiziert und mit einem Schleifwerkzeug angeschliffen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Eihaut nicht verletzt wurde. Nun wurden die Zellen in der Spritze durch vorsichtiges Schwenken nochmals suspendiert und 100 μ l der Suspension (entspricht 1×10^6 Zellen) in die Eier injiziert. Für die Injektion wurden Kanülen der Größe 0,7 x 30mm verwendet, welche bei der Injektion zu ca. zwei Dritteln in das Ei eingeführt wurden. Anschließend wurde die Kalkschale mit erwärmtem Paraffin versiegelt und der Embryo weiter bebrütet. Für injizierte Eier und unbehandelte Kontrollen wurden getrennte Brüter verwendet.

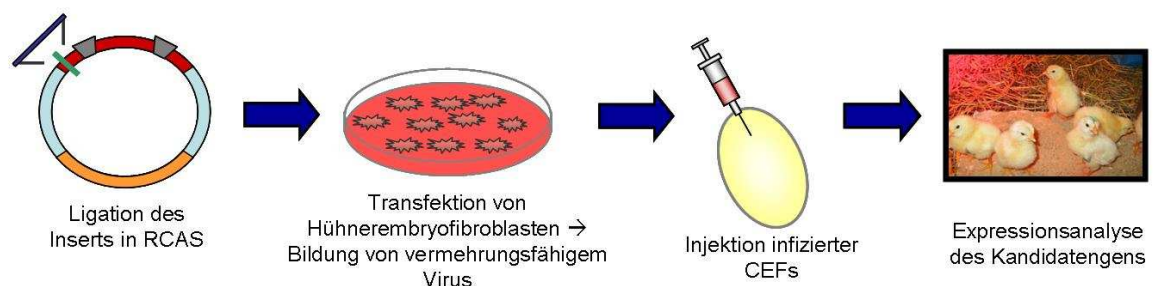


Abbildung 8: Arbeitsablauf zur Erstellung Transgen-exprimierender Hühner mit dem RCAS-System

4.6 Immunisierung

Um die Bildung von antigenspezifischen Antikörpern bestimmen zu können wurden Tiere in der ersten Versuchsphase mit dem Protein Keyhole Limpet Hemocyanin¹² (KLH) immunisiert. Die Gewinnung von Kontrollserum gegen

KLH wurde detailliert in der Arbeit von Morgenroth beschrieben [262].

Zur Charakterisierung der RCAS-Gentransfertechnologie wurden chBAFF-Flag-transduzierte und Kontrolltiere der Linie LSL am Tag 26 mit jeweils 50 µg KLH ohne Adjuvans intraperitoneal immunisiert. Nach drei Wochen erfolgte in gleicher Weise ein Boost. Für Untersuchungen zur Funktion des CD40/CD40L-Systems wurden chCD40-huFc-transduzierte Tiere und die zugehörigen Kontrollen am Tag 24 mit 50 µg Dinitrophenol konjugiertem KLH¹² (DNP-KLH) wie oben beschrieben immunisiert. Auch hier erfolgte ein Boost nach drei Wochen.

4.7 ELISA

4.7.1 Material

NUNC-Maxisorp® Polystyren 96-Lochplatten¹⁵

Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3)¹
6 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)¹
ad 1000 ml Aqua bidest., Einstellung auf pH 9,6, Lagerung bei 4°C

Magermilchlösung 4%

4 g Magermilchpulver¹
ad 100 ml PBS (siehe 4.2.1.1), kurz vor Gebrauch ansetzen

Caseinlösung 1%

1 g Casein¹³
ad 100 ml PBS (siehe 4.2.1.1) pH 7,4, kurz vor Gebrauch ansetzen

PBS-T (0,05% Tween20)

0,5 ml Tween20®¹
ad 1000 ml PBS

TBS-T

5,844 g NaCl ¹
12,114 g TRIS¹
ad 1000 ml Aqua dest.

TMB-Puffer

8,2 g Na-Acetat (CH_3COONa)¹
3,15 g Zitronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$)¹
ad 1000 ml Aqua bidest., Lagerung bei 4°C

TMB Stammlösung

6 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)¹
ad 1 ml DMSO
Lagerung bei Raumtemperatur, lichtgeschützt

TMB Gebrauchslösung

10 ml TMB-Puffer, auf 37°C erwärmt

332 µl TMB Stammlösung

3 µl 30% H₂O₂¹

Lösung kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort verwenden

esTMB¹⁴

Substratpuffer für esTMB

7,09 g Na₂HPO₄¹ (100 mM)

ad 500 ml Aqua dest.

10,507 g Zitronensäure¹ (100 mM)

ad 500 ml Aqua dest.

Vor Gebrauch 60% 100 mM Na₂HPO₄ mit 40% 100 mM Zitronensäure mischen.

Schwefelsäure 1M

472 ml Aqua dest.

28 ml 96% H₂SO₄²

Die Säure vorsichtig unter Rühren über einen Glasstab ins Wasser laufen lassen.

chCD40L-Fusionsprotein [175]

Keyhole Limpet Hemocyanin¹³

Antikörper

Antikörper	gebundenes Antigen	Isotyp	Spezies	Konzentration/ Verdünnung	Referenz
Nachweis von CD40-huFc					
anti-hu-Fc	humanes Fc		Ziege	1 µg/ml	¹⁵
AV79	chCD40	IgG2a	Maus	5 µg/ml	[174]
YTS 169	murines CD8	IgG	Ratte	5 µg/ml	[175]
anti-hu-Fc-POD	humanes Fc		Ziege	1:4000	¹⁵
Nachweis von chBAFF					
anti-Flag-M2	Flag	IgG1	Maus	1 µg/ml	⁵
anti-rab-IgG-POD	Kaninchen IgG	IgG (polyklonal)	Ziege	1:10000	¹⁷
Nachweis von Hühnerimmunglobulin					
A1	chicken IgA	IgG1	Maus	2 oder 5 µg/ml	[263]
M1	chicken IgM	IgG1	Maus	2 oder 5 µg/ml	
G2	chicken IgG	IgG1	Maus	5 µg/ml	
4D12	chicken-IgG	IgG1	Maus	2 µg/ml	
A3-POD	chicken IgA	IgG1	Maus	1:10000	
M2-POD	chicken IgM	IgG2a	Maus	1:1000	
G1-POD	chicken IgG	IgG1	Maus	1:25000	

Tabelle 8: Im ELISA verwendete Antikörper

4.7.2 Durchführung

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden NUNC-Maxisorp® Polystyren 96-Lochplatten über Nacht bei 4°C mit dem gewünschten Antikörper, gelöst in Beschichtungspuffer (siehe 4.7.1), beschichtet. Im Folgenden wurden die Platten zwischen allen Schritten mit Hilfe eines ELISA-Washers je dreimal mit PBS-T gewaschen und in jedem Schritt für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, die Verdünnung der Antikörper erfolgte, sofern nicht anders aufgeführt, in PBS-T.

Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine Kavität der 96-Lochplatte.

4.7.2.1 huFc-ELISA

Die Beschichtung der ELISA-Platten erfolgte mit 100 µl eines anti-huFc Antikörpers. Nach Abwaschen des nicht gebundenen Beschichtungsantikörpers erfolgte die Blockierung der freien Bindungsstellen der Platte mit 200 µl Magermilchlösung, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde die Platte mit 100 µl der zu testenden Zellkulturüberstände oder Plasmen inkubiert, wobei die Überstände in einer log₂-Verdünnung (1:2 bis 1:2048 in PBS-T) aufgetragen wurden. Daran schloss sich die Inkubation mit 50 µl des POD-konjugierten sekundären anti-hu-Fc-Antikörpers an. Der Aufbau des Tests ist in Abbildung 9A dargestellt. Zur Entwicklung des ELISAs wurden 100 µl TMB Gebrauchslösung zugegeben und für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, wobei eine Bindung von chCD40-huFc durch eine Blaufärbung der Probe angezeigt wurde. Ohne Waschen wurde die Reaktion dann durch Zugabe von 50 µl 1M Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erzielt wurde. Zur Quantifizierung wurde der ELISA im Plattenphotometer bei 450 nm gemessen. Zum Vergleich verschiedener Tests wurden diese auf den mitgeführten Kontrollzellkulturüberstand normalisiert. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Zur Normalisierung wurde bei dessen Verdünnung von 1:160 der Wert gleich 1 gesetzt.

4.7.2.2 chCD40-ELISA

Hier erfolgte die Beschichtung der Platte mit 100 µl eines monoklonalen anti-chCD40 Antikörper (AV79), um eine spezifische Bindung dieses Antikörpers an das chCD40-Fc Protein nachzuweisen (siehe Abbildung 9B). Die restlichen Schritte sind zu denen im hu-Fc-ELISA (siehe 4.7.2.19) identisch.

4.7.2.3 chCD40L-ELISA

Mit dem in Abbildung 9C dargestellten ELISA sollte eine Bindung von chCD40-Fc an chCD40L nachgewiesen werden. Hierfür wurde zur Beschichtung der Rattenantikörper YTS 169 verwendet, welcher an Maus-CD8 bindet. Nach Blockierung der freien Bindungsstellen mit 200 µl Magermilchlösung wurde die

Platte mit 100 µl einer Lösung mit 1 µg/ml chCD40L-Fusionsprotein, welches mit einem Maus-CD8-Tag versehen ist, inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des zu testenden Zellkulturüberstands in einer log₂ Titration auf die Platte pipettiert. Schließlich wurde der sekundäre Antikörper auf die Platte gegeben und der ELISA nach einstündiger Inkubation wie oben erwähnt entwickelt.

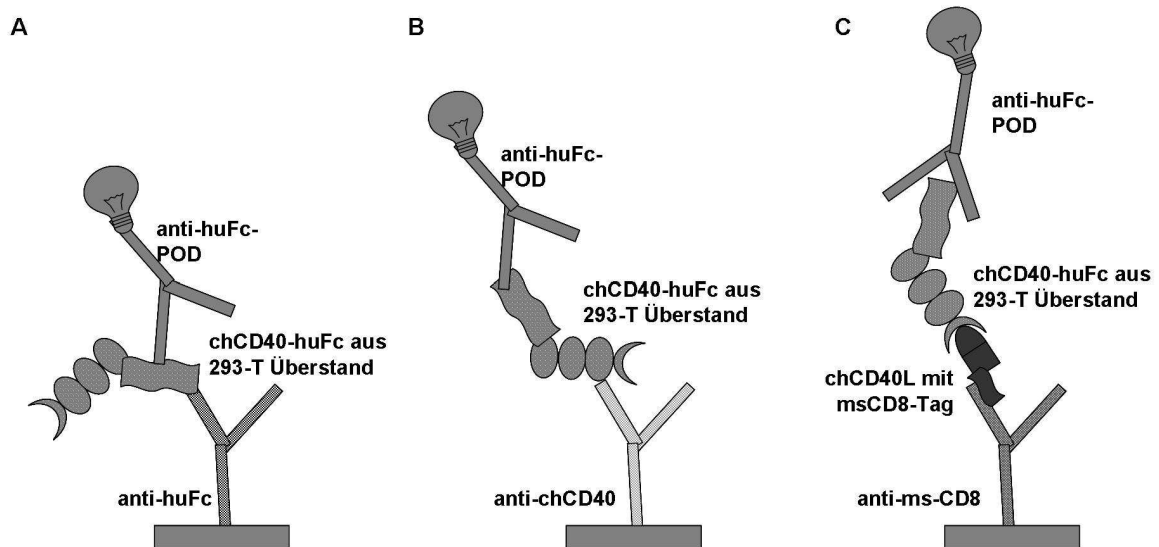


Abbildung 9: ELISAs zum Nachweis von chCD40-huFc

A: huFc-ELISA

B: chCD40-ELISA

C: chCD40L-ELISA

4.7.2.4 chBAFF-Flag-ELISA

Für den Nachweis von chBAFF-Flag im Zellkulturüberstand oder Plasma wurden NUNC-Maxisorp®-Platten mit 100 µl anti-Flag-M2 in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4°C beschichtet. Wiederum wurden freie Bindungsstellen auf der Platte mit 200 µl Magermilchlösung blockiert und anschließend mit 100 µl Zellkulturüberstand oder Plasma inkubiert (in log₂ Verdünnung aufgetragen). Daran schloss sich die Inkubation mit 100 µl des gereinigten polyklonalen anti-chBAFF-IgG [214] an. Als letztes wurden 50 µl anti-rabbit-IgG-POD aufgetragen und der ELISA wurde mit TMB entwickelt. Zum Vergleich verschiedener Tests wurden die Werte auf einen mitgeführten Standard-Zellkulturüberstand bezogen. Beim Test von Plasmaproben von Hühnern der Linie LSL wurde dieser in einer Ausgangsverdünnung von 1:50 eingesetzt. Zur Normalisierung wurde der Wert bei einer Verdünnung von 1:200 gleich 1 gesetzt. Beim Test von Plasmaproben von Hühnern der Linie „0“ wurde ein anderer Standard-Zellkulturüberstand in

einer Ausgangsverdünnung von 1:2 eingesetzt. Hier wurde der Wert bei 1:32 gleich 1 gesetzt.

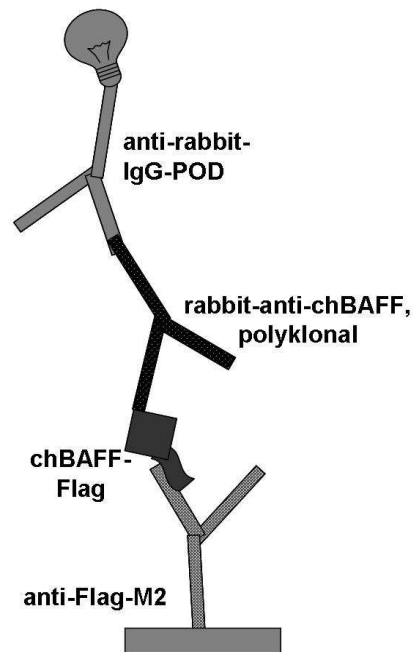


Abbildung 10: Aufbau des chBAFF-Flag-ELISAs

4.7.2.5 Hühner-Immunglobulin-ELISA

Immunglobulin-Bestimmung im Plasma chBAFF-Flag-transduzierter Hühner

Zur Bestimmung der Plasma-Immunglobulintiter der chBAFF-Flag-transduzierten Tiere wurden NUNC-Maxisorp® Polystyren 96-Lochplatten mit je 100 µl der primären Antikörper (A1, M1, G2) in Beschichtungspuffer in einer Konzentration von 5 µg/ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Blockierung der Platte mit 200 µl Magermilchpulver, wurden 100 µl des zu testenden Plasmas als log2 Titration aufgetragen. Dabei lagen den Titrationsreihen folgende Ausgangsverdünnungen in PBS-T zugrunde:

- IgA-Bestimmung: 1: 10 - 1:20 (je jünger die Tiere, desto niedriger die Verdünnung)
- IgM-Bestimmung: 1:20 – 1:50 (je jünger die Tiere, desto niedriger die Verdünnung)
- IgG-Bestimmung: 1:20000

Anschließend folgte die Inkubation mit 50 µl des entsprechenden

Sekundärantikörpers:

- A3-POD: 1:10000
- M2-POD: 1:1000
- G1-POD: 1:25000

Die Entwicklung mit TMB erfolgte analog zur bereits beschriebenen Methode. Zur Normalisierung wurde das mitgeführte Standardhühnerserum in der ersten Verdünnungsstufe gleich 100 Einheiten gesetzt.

Immunglobulin-Bestimmung im Plasma chCD40-huFc-transduzierter Hühner

Zur Bestimmung von Gesamtimmunglobulin im Plasma von chCD40-huFc-transduzierten Tieren wurde ein geändertes Verfahren eingesetzt. Hierfür wurden NUNC-Maxisorp® Polystyren 96-Lochplatten mit 100 µl Beschichtungsantikörper (A1, M1, 4D12) in einer Konzentration von 2 µg/ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach Blockierung mit einer 1% Caseinlösung (pH 7,4) erfolgte die Verdünnung der Plasmaproben in einer log5 Titration. Hierbei richtete sich die initiale Verdünnung teilweise nach dem Alter der Tiere:

- IgA-Bestimmung: 1: 20 - 1:100 (je jünger die Tiere, desto niedriger die Verdünnung)
- IgM-Bestimmung: 1:20
- IgG-Bestimmung: 1:20000

Anschließend wurden 50 µl des entsprechenden Sekundärantikörpers aufgetragen:

- A3-POD: 1:3500
- M2-POD: 1:500
- G1-POD: 1:5000

Plasmaproben und Sekundärantikörper wurden für die Bestimmung von IgA und IgG in PBS-T mit 1% Casein (pH 7,4) verdünnt. Zur IgM-Bestimmung wurde stattdessen TBS-T mit 1% Casein (pH 7,4) verwendet. Die Entwicklung erfolgte in diesen Tests mit *enhanced soluble* TMB (esTMB), welches zuvor 1:3 mit Substratpuffer verdünnt wurde. Zur Normalisierung wurden für das mitgeführte Standardserum folgende Konzentrationen angenommen:

- IgM: 1000 U / ml
- IgG: 100.000 U /ml
- IgA: 1000 U /ml

4.7.2.6 ELISA zum Nachweis von KLH-spezifischem Immunglobulin

Zur Bestimmung antigenspezifischer Antikörpertiter im Plasma von KLH immunisierten RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten Tieren (siehe 4.6) wurden ELISA-Platten mit KLH (in einer Konzentration von 10 µg/ml in Beschichtungspuffer gelöst) über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Als nächster Schritt erfolgte die Blockierung der Platten mit 200 µl Magermilchlösung. Anschließend wurden die zu testenden Plasmen in log2 Verdünnung auf die Platte aufgetragen. Für die Bestimmung von KLH-spezifischem IgM wurde das Plasma in einer Ausgangsverdünnung von 1:20 eingesetzt, für die IgG-Bestimmung wurde dieses initial 1:50 verdünnt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (siehe 4.7.1) und die Entwicklung des ELISAs mit TMB. Zur Normalisierung der einzelnen Tests wurde das mitgeführte Standardhühnerserum in der ersten Verdünnungsstufe gleich 100 Einheiten gesetzt.

4.8 Durchflusszytometrie

In verschiedenen Versuchen wurden Zellen mit Antikörpern fluoreszenzmarkiert und durchflusszytometrisch gemessen. Die Auswertung der generierten Daten erfolgte mit der Software FlowJo 7.1.1.

4.8.1 Material

Fluo-Puffer

5 g bovines Serum Albumin (BSA)¹
50 mg Natrium-Azid (NaN₃)¹
ad 500 ml PBS; Lagerung bei 4°C

FACS-Puffer

100 mg NaN₃¹
ad 1000 ml PBS, Lagerung bei Raumtemperatur

Paraformaldehyd (PFA) 4%

20 g Paraformaldehyd¹
ad 450 ml Aqua bidest., im Wasserbad bei 60°C ca. 1 Stunde rühren, dann einige Tropfen NaOH¹ zugeben um das restliche PFA in Lösung zu bringen, 50 ml 10xPBS zugeben, Lagerung bei 4°C

Permeabilisierungslösung

250 µl Triton X 100¹
ad 50 ml Fluo-Puffer, Lagerung bei 4°C

chCD40L-Fusionsprotein [175]

7 Aminoactinomycin (7AAD)⁵

TruCount®Tubes¹⁸

Antikörper

Klonname	gebundenes Antigen	Zellpopulation	Isotyp	Tierart	Konzentration	Referenz
16-6	CD45	Alle hämatopoietischen Zellen	IgG2a	Maus	Zellkulturüberstand	[264]
LT40	CD45	Alle hämatopoietischen Zellen	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[265]
anti-L-Kette	leichte Kette des Ig-Moleküls	B-Zellen	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[266]
AV20	chB6	B-Zellen	IgG1	Maus	0,5 µg/ml	[267]
M1	IgM	B-Zellen	IgG1	Maus	5 µg/ml	[263]
CT3	CD3	T-Zellen	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[268]
2-6	CD4	CD4-positive T-Zellen	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[269]
3-298	CD8	CD8-positive T-Zellen	IgG2b	Maus	Zellkulturüberstand	[270]
TCR-1	TCR γδ	γδ -T-Zellen	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[271]
TCR-2	TCRα/β1	αβ-T-Zellen	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[272]
TCR-3	TCRα/β2	αβ-T-Zellen	IgG1	Maus	Zellkulturüberstand	[273]
AV79	chCD40	B-Zellen, Monozyten/Makrophagen	IgG2a	Maus	2 µg/ml	[174]
YTS169	Maus-CD8	Maus-CD8	-	Ratte	1,25 mg/ml	[175]
AMV-3C2*	Retrovirales Protein p19	Retrovirus infizierte Zellen	IgG1	Maus	1:500	[69]

Tabelle 9: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Primärantikörper

*Das Hybridom für den monoklonalen Antikörper AMV-3C2 (Potts et al. [69]) wurde von der Developmental Studies Hybridoma Bank zur Verfügung gestellt, unter der Schirmherrschaft des NICHD entwickelt und wird in der University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242, unterhalten.

Antikörper	Verdünnung
anti-Maus-IgG-FITC ¹⁵	1:250
anti-Maus-IgG-PE ¹⁵	1:300
anti-Maus-IgG1-FITC ¹⁵	1:50
anti-Maus-IgG2a-FITC ¹⁵	1:50
anti-Maus-IgG1-PE ¹⁵	1:300
anti-Maus-IgG2a-PE ¹⁵	1:300
anti-Ratten-IgG-FITC ¹⁵	1:200

Tabelle 10: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Sekundärantikörper

4.8.2 Durchführung

Die im Folgenden genannten Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine Kavität der zum Färben benutzten 96-Loch-Rundboden-Platten. Zur Verdünnung von Antikörpern wurde Fluo-Puffer eingesetzt. Alle Inkubationsschritte fanden auf Eis und im Dunkeln statt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Zellen, soweit nicht anders beschrieben, mit 150 µl Fluo-Puffer gewaschen.

4.8.2.1 Doppelfärbung

Ca. 1×10^6 Zellen/Kavität wurden auf eine 96-Loch-Platte transferiert und durch einminütige Zentrifugation bei 716xg pelletiert. Die Zellpellets wurden in je 100 µl einer beide primären Antikörper enthaltenden Lösung resuspendiert und für 25 Minuten inkubiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass beide Primärantikörper unterschiedliche Isotypen aufwiesen. Nach dem Waschen durch Zugabe von 150 µl Fluo-Puffer und erneuter Zentrifugation, wurden die Zellen für 20 Minuten in 50 µl der Lösung mit den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (Zugabe von 150 µl Fluo-Puffer, Zentrifugation) wurden die Zellen zur Messung in 400 µl Fluo-Puffer aufgenommen und in geeignete Probenröhrchen überführt und am Durchflusszytometer gemessen.

4.8.2.2 Dreifachfärbung

Bei FACS-Dreifachfärbungen wurde ähnlich wie bei in 4.8.2.1 beschriebenen indirekten Doppelfärbungen vorgegangen. Zunächst wurden die ausplattierten Zellen mit der zwei Primärantikörper enthaltenden Lösung inkubiert. Der die zugehörigen FITC- und PE-konjugierten Sekundärantikörper enthaltenden Lösung wurde jedoch zusätzlich ein anti-CD45-Antikörper (LT40) zugegeben, welcher mit Spektralrot (SPRD) konjugiert ist (LT40-SPRD¹⁸). Dieser Farbstoff kann in der Fluoreszenz 3 des Durchflusszytometers detektiert werden. Da dieses Direktkonjugat ein IgM-Antikörper ist, wurde es von den zusätzlich eingesetzten Sekundärantikörpern nicht gebunden. Somit war es möglich in dieser Fluoreszenz alle Leukozyten zu differenzieren, welche dann in den Fluoreszenzen 1 und 2 weiter analysiert wurden.

4.8.2.3 chCD40-Fc Inhibition

Zum Nachweis der Bindung des chCD40-huFc-Proteins an seinen Liganden wurde eine FACS-Färbung auf der Hühnermakrophagen-Zelllinie HD11 etabliert. Diese Zellen exprimieren in hohem Maße chCD40 auf der Oberfläche.

HD11 Zellen wurden mit PBS-EDTA abgelöst, gewaschen und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Delle auf eine 96-Loch-Rundbodenplatte ausgesäht. Diese wurden nach Zentrifugation für eine Minute bei 716xg wahlweise mit chCD40L alleine oder mit chCD40L, welcher mit chCD40-huFc enthaltendem Zellkulturüberstand für eine Stunde bei 37°C präinkubiert wurde, für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschriff wurde der Rattenantikörper YTS 169, welcher an das Maus-CD8-Tag des CD40L-Fusionsprotein bindet, zugegeben. Dieser wurde nach nochmaligem Waschen mit einem FITC-konjugierten anti-Ratten-IgG-Antikörper detektiert. Der Aufbau dieser Färbung ist in Abbildung 11 graphisch dargestellt. Als Positivkontrolle wurde chCD40L mit dem Antikörper AV79 angefärbt, welcher den extrazellulären Anteil des chCD40-Moleküls erkennt. Dieser wurde mit einem anti-Maus-FITC-Konjugat detektiert. Vor der Messung wurde den Proben 7AAD zugegeben, um lebende von toten Zellen differenzieren zu können.

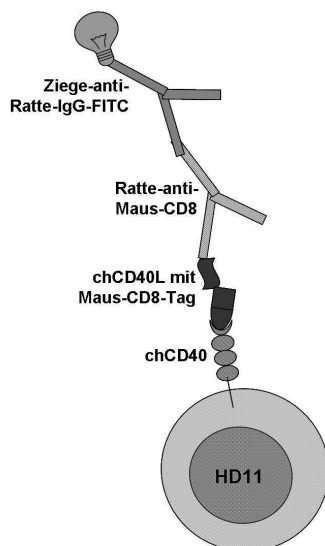


Abbildung 11: Färbung von chCD40 auf HD11 Zellen

4.8.2.4 Zytoplasmatische Färbung zum Nachweis von Virusprotein

Für den Nachweis von Virusprotein wurden transfizierte HEF in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Kavität auf eine 96-Loch-Platte gegeben und abzentrifugiert. Zur Fixierung wurden die Zellen mit 4% PFA für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Inkubation mit Permeabilisierungslösung für 20 Minuten auf Eis. Um sicherzustellen, dass die dabei gebildeten Poren in der Membran verbleiben, wurden im Folgenden alle weiteren Antikörper in dieser Lösung verdünnt. Anschließend wurden die Zellen weitere 20 Minuten mit dem Antikörper AMV-3C2 inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper auszuwaschen, wurden die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Permeabilisierungslösung inkubiert. Schließlich wurde der sekundäre anti-Maus-IgG1-PE Antikörper zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 20 Minuten wurden die Zellen abzentrifugiert, in 400 µl Fluo-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

4.8.2.5 Durchflusszytometrische Bestimmung der absoluten Zellzahl in Vollblut

Die Bestimmung der Zellzahl in Vollblut wurde mit Hilfe von Beads (TruCount-Tubes, Becton Dickinson) mittels einer sog. „no lyse – no wash“ Technik durchgeführt. Hierbei wurden direkt konjugierte Antikörper verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der von Seliger et al. entwickelten Methode und ist in der zugehörigen Arbeit detailliert beschrieben [274].

4.9 Histologie

4.9.1 Material

PBS

Tissue Tec® Compound²⁰

SuperFrost®Plus Objektträger²⁰

Aceton¹⁰

auf 4°C gekühlt

4'6'Diamidino-2-phenylindol (DAPI)¹⁰

DAPI-Stammlösung

5 mg DAPI

ad 1 ml Aqua dest.

Lagerung lichtgeschützt bei -20°C

30% H₂O₂¹

Methanol⁹ 40%

Bovines Serumalbumin (BSA)¹

Pferdeserum

Primäre Antikörper

Anti-körper	gebundenes Antigen	Zelltyp / Struktur	Verdünnung Milz	Verdünnung Bursa	Referenz
Bu1	chB6.1 und chB6.2	B-Zellen	1:100	1:200	[275]
G1	IgG	B-Zellen	0,05 µg/ml	0,05 µg/ml	[263]
M1	IgM	B-Zellen	1:1500	1:1500	
K3	IgA	B-Zellen	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	
Kul 01	unbekannt	myeloide Zellen	1:50	1:2	[276]
BB3	unbekannt	Kortikomedulläre Grenzschicht in der Bursa fabricii	-	1:10	[277]
AMV-3C2*	retrovirales Protein p19	RCAS(BP)A-infizierte Zellen	1:1000	1:1000	[69]

Tabelle 11: In der Immunhistologie eingesetzte Primärantikörper

Die optimale Verdünnung der Antikörper ist organspezifisch unterschiedlich und wurde für jedes Organ zuvor austitriert.

*Das Hybridom für den monoklonalen Antikörper AMV-3C2 (Potts et al. [69]) wurde von der Developmental Studies Hybridoma Bank zur Verfügung gestellt, unter der Schirmherrschaft des NICHD entwickelt und wird in der University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242, unterhalten.

Vectastain ABC-Kit PK-4002²¹

enthält biotinylierten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper

Lagerung bei 4°C

Peroxidase Substrat Kit²¹

Lagerung 4°C

Aqua dest.

Mayer's Hematoxilin Solution¹

Lagerung bei RT

Aufsteigende Alkoholreihe

Ethanol⁷ 70%

Ethanol⁷ 96%

Isopropanol⁷ 1

Isopropanol⁷ 2

Xylol⁷ 1

Xylol⁷ 2

Lagerung bei Raumtemperatur im Abzug

Eukitt® Eindeckelmedium⁵

Lagerung bei Raumtemperatur

4.9.2 Gewinnung von Organen und Vorbereitung für die Histologie

Hühner der Linien LSL und „0“ wurden betäubt und durch Blutentzug getötet. Nach Eröffnung des Abdomens wurden Herz, Milz, Zäkaltonsillen und Bursa fabricii entnommen. Sie wurden je nach Anzahl der geschlachteten Tiere sofort in geeigneten Behältnissen in Tissue Tec® Compound eingebettet oder für kurze Zeit in auf Eis stehende Röhrchen mit PBS gegeben. Nach der Einbettung wurden die Einbettschälchen bis zum vollständigen Durchfrieren in flüssigen Stickstoff gehalten. Dabei wurde darauf geachtet, dass kein Stickstoff auf die Oberfläche des Tissue Tecs® fließt, da es sonst zur Blasenbildung kommt. Die Lagerung der Organblöcke erfolgte bei -80°C.

4.9.3 Fluoreszenz von Eihäuten

Um RCAS(BP)A-basiertes eGFP in Eihäuten transduzierter Embryonen nachzuweisen, wurde Allantochorion präpariert und in einer Plastikpetrischale mit Hilfe von Kanülen gespannt. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Eihäute für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit DAPI in einer Konzentration von 0,1 µg/ml inkubiert. Es folgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung.

4.9.4 Herstellung von Gewebeschnitten

Die bei -80°C gelagerten Organblöcke wurden ein bis zwei Tage vor dem Schneiden auf -20°C gelegt. Mit Hilfe des Mikrotom-Kryostant HM500 OM der Firma Microm wurden Gefrierschnitte in einer Dicke von 6-8 µm angefertigt. Die Temperatur im Inneren des Geräts sowie jene des Objektisches wurden dem Fettgehalt des zu schneidenden Organs angepasst. Diese lagen bei -14°C bis -17°C. Die Schnitte wurden auf spezielle Objektträger (SuperFrost®Plus) gezogen und nach einstündigem Trocknen bei Raumtemperatur für 2 Minuten in gekühltem Aceton fixiert. Nun wurden die Präparate entweder sofort gefärbt oder bis zur Verwendung für wenige Tage bei -20°C gelagert.

4.9.5 Immunhistologische Färbung von Gefrierschnitten

Soweit nicht anders erwähnt erfolgten alle Inkubationsschritte in einer feuchten

Kammer. Die Präparate wurden zwischen allen Inkubationsschritten dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen.

Immunhistologische Färbung

Frische Gefrierschnitte wurden für 15 Minuten in PBS rehydriert, Schnitte welche bei -20°C aufbewahrt worden waren, wurden zuvor 15 Minuten lang bei Raumtemperatur aufgetaut. Soweit nicht anders erwähnt, wurde zur Blockierung endogener Peroxidase eine Lösung von 0,3% H₂O₂ in 40% Methanol auf die Schnitte getropft. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Um die Reaktion zu stoppen wurden die Schnitte anschließend in einer Küvette für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert und danach mit PBS gewaschen. An dieser Stelle wurden die Präparate auf dem Objektträger mit einem hydrophoben Markierstift umkreist, um einerseits ein Austrocknen zu verhindern, jedoch andererseits die Reagenzien möglichst sparsam einsetzen zu können. Um unspezifische Färbung zu vermindern, wurden die Schnitte nun eine Stunde lang mit einer Blockierlösung inkubiert. Zur Herstellung dieser wurden 0,1 g BSA in 10 ml PBS gelöst. Darin wurde Serum der Spezies, in welcher der Sekundärantikörper generiert worden ist (hier Pferdeserum), 1:40 verdünnt. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Schnitte nicht mit PBS gewaschen, sondern das Serum wurde vorsichtig von den Schnitten abgekippt. Danach wurde der Primärantikörper in der austitrierten Verdünnung auf die Schnitte gegeben. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Schnitt anstatt mit Primärantikörper mit PBS inkubiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Morgen wurden die Präparate zunächst mit PBS gewaschen und sogleich mit biotinyliertem anti-Maus-IgG-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. 15 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wurde das Avidin-Peroxidase-Reagenz nach Herstellerangaben hergestellt und 30 Minuten (bis zum Abschluss der Waschschrte) bei Raumtemperatur gelagert. Das Reagenz wurde auf die Präparate gegeben und die Schnitte wurden weitere 60 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das Entwickeln der Schnitte mit dem Diaminobenzidin (DAB) enthaltenden Peroxidase-Substrat-Kit nach Angaben des Herstellers. Die Schnitte wurden 2 Minuten mit der hergestellten Lösung inkubiert und diese wurde vorsichtig in ein speziell für DAB

haltigen Flüssigabfall bereitgestelltes Behältnis abgekippt. Danach wurde die Reaktion unter fließendem Leitungswasser (5 Minuten) gestoppt und in Aqua dest. überführt.

Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalan

Um das Gewebe besser darstellen zu können, folgte direkt auf die immunhistologische Färbung eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalan. Die Schnitte wurden hierfür aus dem destillierten Wasser für 30 bis 40 Sekunden in Hämalan überführt. Überschüssiges Hämalan wurde durch kurzes Eintauchen der Schnitte in Aqua dest. abgewaschen. Im Anschluss daran erfolgte das sog. Bläuen der Präparate für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Hierbei bildet das Hämalan einen Komplex mit Calciumionen aus dem Leitungswasser, welcher eine blaue Färbung bewirkt.

Entwässern und Eindeckeln der Schnitte

Um die Schnitte dauerhaft haltbar zu machen, wurden sie zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Sie wurden unter einem Abzug für jeweils fünf Minuten in die entsprechende Alkohollösung gestellt. Als letztes wurde je ein bis zwei Tropfen Eukitt® Eindeckelmedium auf ein passendes Deckglas gegeben und dieses vorsichtig mit Hilfe eines spitzen Gegenstandes auf das Präparat gelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des retroviralen Gentransfersystems RCAS

5.1.1 Erstellung der Vektoren und Klonierung

Zur näheren Charakterisierung des in Abbildung 12 dargestellten retroviralen Vektorsystems RCAS wurden beim Einsatz *in ovo* und *in vivo* einerseits ein GFP- sowie ein eGFP-Konstrukt, andererseits auch Konstrukte mit den Inserts chBAFF-Flag, chBAFF-Flag rv und huBCMA-Fc verwendet. Letztere wurden ausgewählt, weil die Wirkung des Zytokins chBAFF sowie seines Decoy-Rezeptors huBCMA-Fc *in vivo* an jungen Küken bereits untersucht wurden [12, 13] und so Vergleiche zu Studien mit rekombinantem Protein möglich sind. Die Konstrukte RCAS(BP)A-chBAFF-Flag, RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv, RCAS(BP)A-huBCMA-Fc und RCAS(BP)A-GFP wurden von Dr. Sonja Kothlow kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt RCAS(BP)A-eGFP wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Alle verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 13 dargestellt.

Da der Vektor RCAS(BP)A ausschließlich eine *ClaI* Schnittstelle enthält, besteht die Möglichkeit, dass das Insert in zwei Orientierungen eingebaut wird. Das Konstrukt RCAS(BP)A-BAFF-Flag rv enthält die Sequenz des Inserts in falscher Orientierung. Nach einer Transfektion kommt es hier nicht zur Produktion von funktionsfähigem Protein. Um jedoch virusspezifische Effekte und Wechselwirkungen ausschließen zu können, wurde dieses Konstrukt neben RCAS(BP)A-Vektor ohne Insert als Negativkontrolle verwendet.

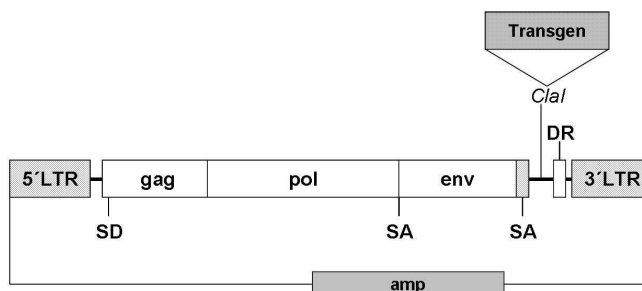


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Vektors RCAS(BP)A

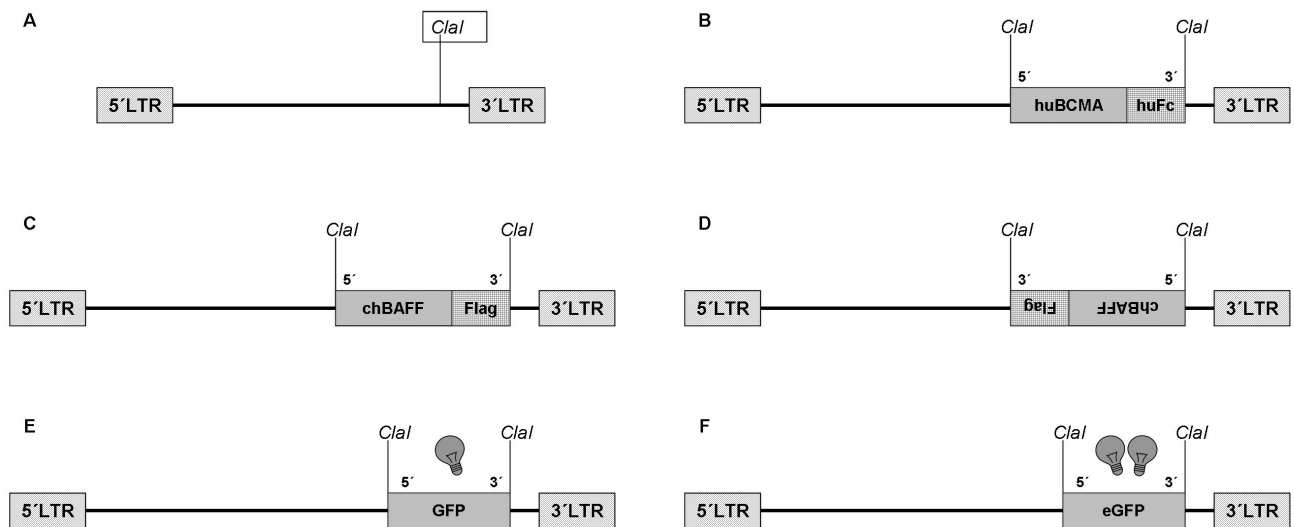


Abbildung 13: Darstellung der zur Charakterisierung des RCAS-Systems verwendeten Konstrukte

A: RCAS(BP)A, ohne Insert

B: RCAS(BP)A-huBCMA-Fc

C: RCAS(BP)A-chBAFF-Flag

D: RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv

E: RCAS(BP)A-GFP

F: RCAS(BP)A-eGFP

Das Ausgangsplasmid für die Klonierung von eGFP in RCAS(BP)A war der Vektor pEGFP-N1. Die Zielsequenz für eGFP wurde mittels PCR amplifiziert, wobei hierbei spezifische Primer verwendet wurden, welche an das Insert beiderseits je eine *Clal* Schnittstelle anfügten (siehe 4.3.2). Das erhaltene Amplifikat wies eine Länge von 725 bp auf (siehe Abbildung 14). Ebenso wurde der RCAS(BP)A-Vektor mit *Clal* verdaut und über ein präparatives Gel aufgereinigt. Der gereinigte Vektor wurde mit einer Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Danach wurden Vektor und Insert mit einer T4-Ligase zusammengefügt. Das so erhaltene Plasmid wurde in *E. coli* des Stamms JM 109 transformiert und auf einer Agarplatte ausgestichen. Eine Bakterien-PCR von Einzelkolonien, bei der Primer verwendet wurden, welche am RCAS(BP)A-Vektor kurz vor bzw. nach der Insertionsstelle binden, bestätigte den Erfolg der Ligation (siehe Abbildung 15). Als Positivkontrolle wurde das Konstrukt RCAS(BP)A-chBAFF-Flag eingesetzt.

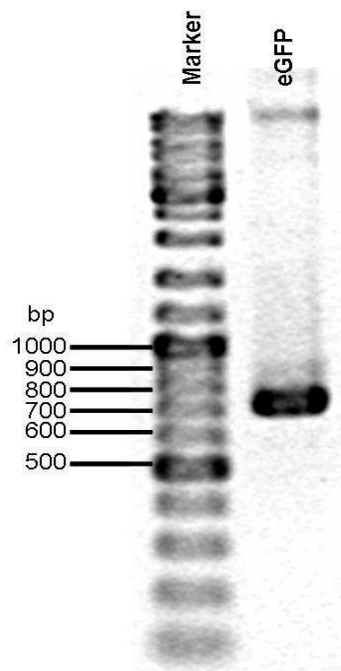


Abbildung 14: Agarosegel nach dem Verdau von pEGFP-N1

Das eGFP-Fragment wurde mittels PCR auf dem Ausgangsplasmid pEGFP-N1 amplifiziert. 5 µl des PCR-Produkts wurden zur Überprüfung der Länge auf ein Agarosegel aufgetragen.

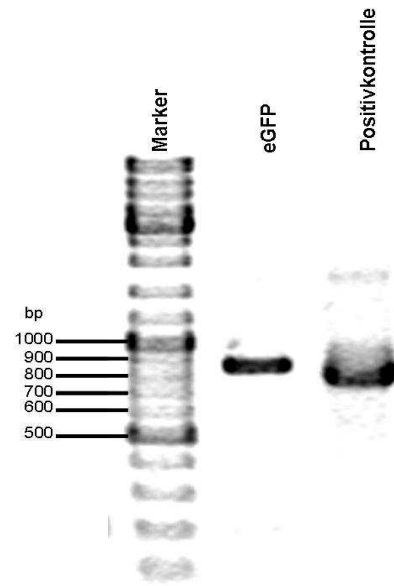


Abbildung 15: Agarosegel nach erfolgter Bakterien-PCR

Mit einer Bakterien-PCR auf transformierten *E. coli* des Stamms JM 109 wurde der Erfolg der Ligation von eGFP in RCAS(BP)A überprüft. PCR-Produkte von Template (links), Positivkontrolle RCAS(BP)A-chBAFF-Flag (Mitte) und Negativkontrolle wurden auf ein Agarosegel aufgetragen

Da die für die Klonierung verwendeten Primer beiderseits eine *ClaI* Schnittstelle anfügten, erfolgte zur Orientierungskontrolle der eGFP-Sequenz eine zusätzliche PCR, bei welcher nun ein Primer kurz vor dem Insert und einer am Ende des Inserts binden sollten. Bei falscher Orientierung würde ein Amplifikat von nur wenigen Basenpaaren entstehen. Bei richtiger Orientierung jedoch entsteht eines mit einer Länge von mehr als 800 Basenpaaren (siehe Abbildung 16). Als Positivkontrolle wurde ein Primerpaar eingesetzt bei dem sowohl sense als auch antisense Primer außerhalb des Inserts binden. Daher weist dieses Amplifikat eine geringfügig längere Basenpaarsequenz auf.

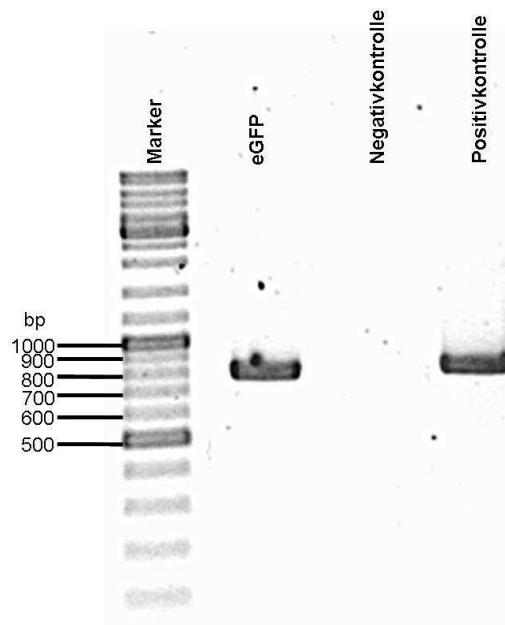


Abbildung 16: Orientierungskontrolle des ligierten Inserts

Jeweils 5 µl der PCR-Produkte der Ligation (links), Negativkontrolle (Mitte) und Positivkontrolle (rechts) wurden zur Kontrolle der Orientierung des ligierten Inserts auf ein Agarosegel aufgetragen.

5.1.2 Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein in Fibroblasten

Zur Überprüfung ihrer Funktionalität wurden nun, wie in 4.4.2 beschrieben, die RCAS(BP)A-Vektoren für chBAFF-Flag, chBAFF-Flag rv und huBCMA-Fc in primäre Hühnerembryofibroblasten (HEF) transfiziert. Hierbei wurden einerseits Fibroblasten der Hühnerlinie „0“ verwendet. Zudem stellte die Firma Lohmann Tierzucht befruchtete Eier der Linie LSL zur Verfügung, aus welchen HEF präpariert wurden.

5.1.2.1 Expression von eGFP und GFP

Da HEF nach einer Transfektion mit RCAS(BP)A vermehrungsfähiges Virus bilden, erfolgt innerhalb der Kultur auch eine Transduktion der nicht transfizierten Zellen. In einem Versuch wurden HEF der Linie „0“ mit RCAS(BP)A-eGFP transfiziert. Binnen 3 Tagen erreichte die Kultur eine Infektionsrate von annähernd 100% (siehe Abbildung 17).

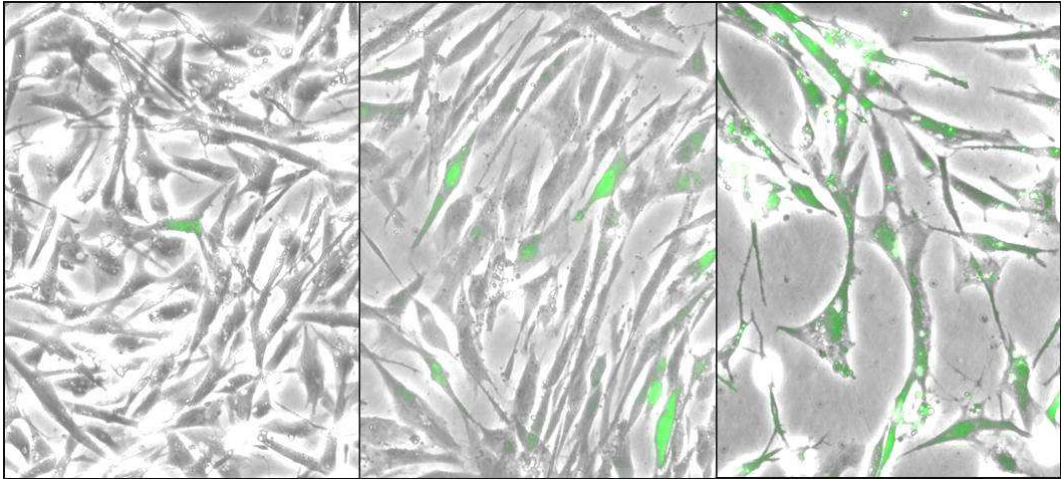


Abbildung 17: Fluoreszenz eGFP transfizierter/transduzierter HEF
HEF der Linie „0“ wurden mit RCAS(BP)A-eGFP transfiziert und nach 24, 48 und 72 Stunden fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

In einem weiteren Versuch wurde die Fluoreszenz RCAS(BP)A-GFP-transduzierter Zellen gemessen. Hier wurde die Expression von GFP gewählt, da die Fluoreszenz von eGFP sehr hoch ist und eine zusätzliche Fluoreszenzfärbung im Durchflusszytometer kaum noch gemessen werden kann. Hier erfolgte zusätzlich eine indirekte Färbung mit dem Antikörper AMV-3C2, welcher das virale zytoplasmatische Protein p19 erkennt. Dieser konnte mit einem PE-konjugierten Sekundärantikörper detektiert werden. Hierfür wurden die Zellen in der in 4.8.2.4 beschriebenen Weise fixiert und permeabilisiert. Dieses Verfahren führt zu einer Verminderung der Fluoreszenz von GFP, was die relativ niedrige GFP-Fluoreszenz der Zellen erklärt. An Hand der gezeigten Doppelfärbung wird jedoch deutlich, dass die gesamte grün fluoreszierende Zellpopulation auch für die Färbung gegen p19-positiv ist (siehe Abbildung 18). Die Färbung lässt darauf schließen, dass alle virusinfizierten Zellen, welche das Protein p19 produzieren, auch das Transgen GFP exprimieren.

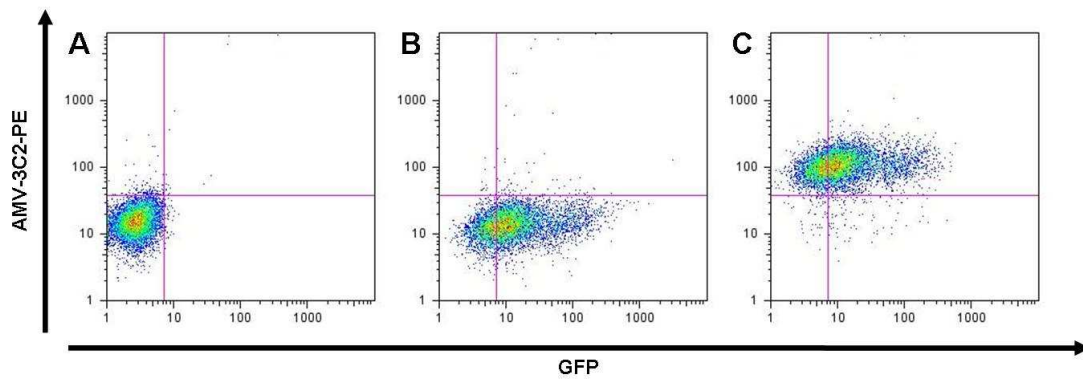


Abbildung 18: FACS Analyse GFP-transfizierter Linie „0“ Fibroblasten

HEF der Linie „0“ wurden mit RCAS(BP)A-GFP transfiziert und 72 Stunden später zytoplasmatisch mit einem Antikörper gegen virales Protein p19 (AMV-3C2) und einem sekundären PE-konjugierten Antikörper gefärbt.

Dargestellt sind untransfizierte Zellen (A), RCAS(BP)A-GFP transfizierte Zellen ohne Primärantikörper (B) und deren Färbung mit dem Antikörper AMV-3C2 (C).

Zusätzlich wurden HEF (Linie „0“, LSL A und LSL C) mit dem zuvor hergestellten RCAS(BP)A-eGFP Konstrukt transduziert (siehe 5.1.1). An Hand von Abbildung 19 wird deutlich, dass sich die Infizierbarkeit von Fibroblasten verschiedener genetischer Hintergründe erheblich unterscheidet. Zellen der Linien „0“ und LSL A konnten 72 Stunden nach Transfektion zu fast 100% als eGFP-positiv detektiert werden, wohingegen in HEF der Linie LSL C zu weniger als 40% eine Expression von RCAS-basiertem eGFP nachweisbar war.

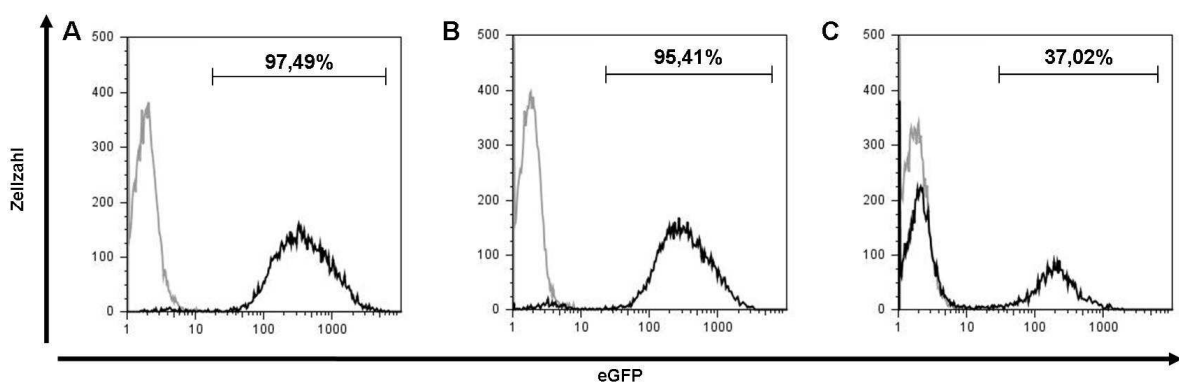


Abbildung 19: eGFP -Expression in HEF der Linien „0“, LSL A und LSL C

Fibroblasten der Linien „0“ (A), LSL A (B) und LSL C (C) wurden mit RCAS(BP)A-eGFP transfiziert. Nach 72 Stunden erfolgte eine durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenz. Dargestellt ist jeweils ein Vergleich zwischen untransfizierten (graue Linie) und transfizierten Zellen (schwarze Linie).

5.1.2.2 Expression von chBAFF-Flag und huBCMA-Fc

Um eine Aussage über die biologische Aktivität der virusbasierten Proteine zu erhalten, mussten Versuche mit einem Zytokinsystem erfolgen, dessen biologische Wirkung schon weitgehend bekannt ist. Hierfür wurden das Protein chBAFF-Flag und der zugehörige lösliche Decoy-Rezeptor (huBCMA-Fc) gewählt [12]. Um unspezifische Wirkungen des Virus auszuschließen, wurden für diese Versuche HEF mit RCAS(BP)A Vektor ohne Insert als Negativkontrolle transfiziert.

Zum Nachweis der Sekretion der löslichen Proteine chBAFF-Flag und huBCMA-Fc wurde Zellkulturüberstand von drei bis vier Tage zuvor transfizierten Linie „0“ Fibroblasten gewonnen und dieser als Probe im ELISA aufgetragen.

Das Protein chBAFF war bei der Klonierung mit einem Flag-Tag versehen worden [13], welches nun im ELISA mit einem anti-Flag-Antikörper detektiert werden konnte (siehe 4.7.2.4). Hierbei konnte ein deutlicher Gehalt an chBAFF-Flag im Überstand transfizierter HEF detektiert werden. Als Negativkontrolle wurde Überstand von RCAS(BP)A-transduzierter aufgetragen.

Da das Protein huBCMA-Fc mit einem humanen Fc-Fragment versehen ist, konnte dieses mittels anti-Fc Antikörpern in einem Sandwich-ELISA (Aufbau siehe 4.7.2.1) detektiert werden. Überstand RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierter Zellen wurde in einer Ausgangsverdünnung von 1:10 (in PBS-T) aufgetragen. Überstand RCAS(BP)A transduzierter Zellen diente wiederum als Negativkontrolle. Es konnte auch bei dem RCAS(BP)A-huBCMA-Fc Konstrukt eine deutliche Expression in Linie „0“ Fibroblasten festgestellt werden.

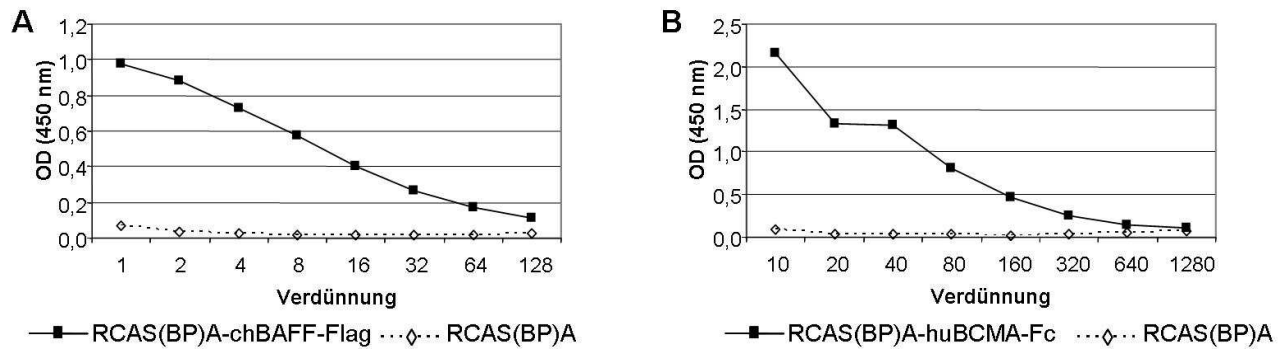


Abbildung 20: Nachweis der Expression von RCAS(BP)A-basiertem chBAFF-Flag und huBCMA-Fc im ELISA

Zellkulturüberstand von RCAS(BP)A-chBAFF-Flag (A) und -huBCMA-Fc (B)-transduzierten Zellen wurde drei bzw. vier Tage nach Transfektion als Probe im ELISA aufgetragen

5.1.3 *In vivo*-Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein

Nachdem die Expression RCAS(BP)A-basierter Proteine in transduzierten Zellen nachgewiesen werden konnte, schlossen sich nun Versuche zur *in vivo*-Expression an.

5.1.3.1 Histologische Untersuchungen zur Virusexpression

Hierbei wurden zunächst die Lokalisation des Virus im Tierkörper sowie die Menge des löslichen Proteins im Plasma untersucht. Außerdem wurden Untersuchungen am B-Zell-System der Hühner durchgeführt, um Informationen über die biologische Aktivität des RCAS(BP)A-basierten Proteins zu gewinnen.

eGFP in Eihäuten

In ersten Schritten wurde die Lokalisation des RCAS(BP)A Virus in Eihäuten zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten transduzierter Hühnerembryonen analysiert. Mit RCAS(BP)A-eGFP transfizierte Zellen wurden in Tag 3 embryonierte Hühnereier der Linien „0“ und LSL injiziert (siehe 4.5). Anschließend wurden diese weiter bebrütet. An den Embryonaltagen 10 und 14 wurden Eier entnommen, die Eihäute präpariert und nach einer Kernfärbung mit DAPI (siehe 4.9.3) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie in Abbildung 21 dargestellt, konnte hierbei eindeutig Fluoreszenz in den Eihautgefäßen transduzierter Feten nachgewiesen werden. Beim Vergleich von Allantochorion

aus LSL und Linie „0“ Eiern waren in den LSL Eihäuten deutlich weniger grün fluoreszierende Gefäße zu finden. Auch fiel auf, dass die Gesamtzahl der fluoreszierenden Zellen bei Eihäuten von Embryonen der Linie LSL geringer war als bei Linie „0“ Embryonen.

Immunhistologische Färbung von Virusprotein

Für die angestrebte Verwendung des RCAS-Systems für *in vivo*-Studien ist es von entscheidender Bedeutung, in welchen Zellen das Virus im Organismus lokalisiert ist. Um Aufschluss darüber zu erhalten, wurden LSL Embryonen mit RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierten Zellen infiziert.

Zunächst wurden Organproben von Milz, Herz, Thymus und Bursa fabricii von Versuchstieren am 14. Lebenstag gewonnen, diese eingebettet, geschnitten und schließlich mit dem gegen das Virusprotein p19 gerichteten Antikörper AMV-3C2 gefärbt (siehe 4.9). Die schon in den Eihäuten beobachtete Präferenz des Virus für Gefäße, konnte, wie Abbildung 22 zeigt, in diesen Versuchen bestätigt werden. In den gefärbten Milzen konnte eine deutliche Anfärbung der Gefäße festgestellt werden. Arterien, welche an einer deutlichen Ausprägung der Tunica muscularis erkennbar sind und besonders auch kleine Gefäße (Arteriolen, Venolen, Kapillaren) konnten mit dem genannten Antikörper angefärbt werden (siehe Abbildung 22A, B). Wahrscheinlich handelt es sich bei den positiven Zellen um das Gefäßendothel. Das gleiche Bild war auch bei der Färbung des Thymus zu beobachten (siehe Abbildung 22F). Auch in der Bursa fabricii konnte virales Protein p19 angefärbt werden. Wie Abbildung 22 (C, D) zeigt, waren neben dem Gefäßendothel Zellen im Follikelmark, aber auch interfollikuläre Zonen positiv. Eine sehr hohe Expression konnte auch im Herzmuskel nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22E). In dem Versuch mitgeführte Kontrollschnitte von untransduzierten Tieren zeigten keine Färbung (Abbildung 22G und H).

Nachdem nun die genauere Lokalisation des RCAS(BP)A Virus in verschiedenen Organen gezeigt worden war, sollte in einer weiteren Versuchsreihe die Virusexpression auch zu anderen Entwicklungszeitpunkten histologisch dargestellt werden. Es wurden Proben der Bursa fabricii am Embryonaltag 18 und

am 63. Lebenstag gewonnen. Auch in den daraus erstellten Gefrierschnitten wurde mit dem Antikörper AMV-3C2 das virale Protein p19 angefärbt. Bereits am Embryonaltag 18 konnten in den sich entwickelnden Bursafollikeln eindeutig positive Zellen nachgewiesen werden. Zudem waren Zellen des Follikelepithels angefärbt (siehe Abbildung 23A, B). Auch in den Schnitten von *Bursae fabricii* jung adulter Tiere am 63. Lebenstag konnte Virusprotein im Follikelmark und zwischen den Follikeln nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23C, D). Auch in der Milz war am Tag 63 noch p19-Expression nachzuweisen. Hier zeigte sich wieder die typische Färbung der Gefäßendothelien (siehe Abbildung 23E, F). Auch in diesem Versuch waren Schnitte untransfizierter Kontrolltiere negativ (nicht gezeigt).

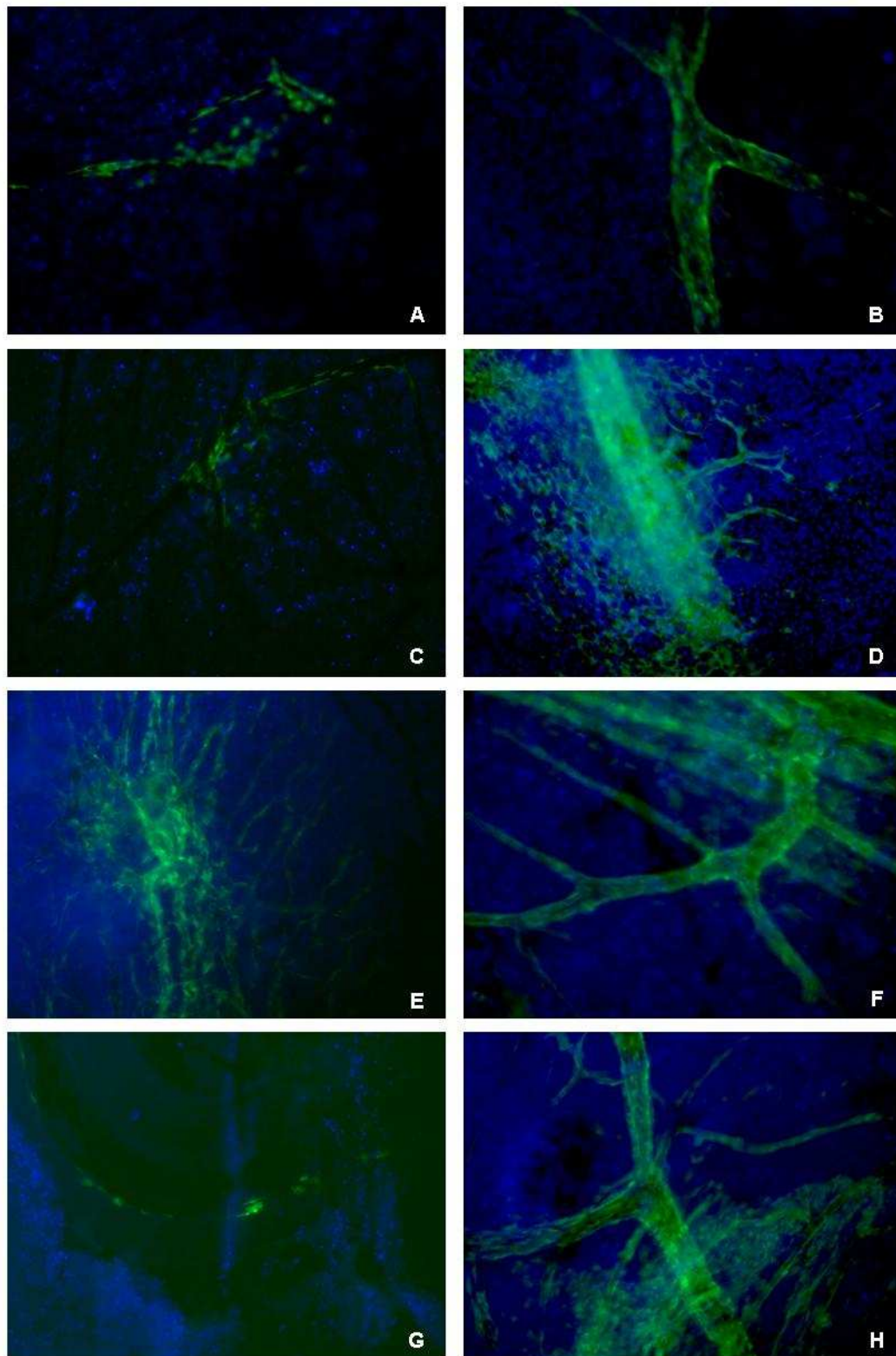


Abbildung 21: Allantochorion RCAS(BP)A-eGFP-transduzierter Hühnerembryonen an den Embryonaltagen 10 und 14

An den Embryonaltagen 10 (A-D) und 14 (E-H) wurde aus RCAS(BP)A-eGFP infizierten Eiern der Linien LSL (links) und „0“ (rechts) Allantochorion präpariert.

Die Eihäute wurden vor der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung für 30 Minuten mit DAPI (0,1µg/ml) inkubiert. Gezeigt sind Aufnahmen in einer 200fachen Vergrößerung.

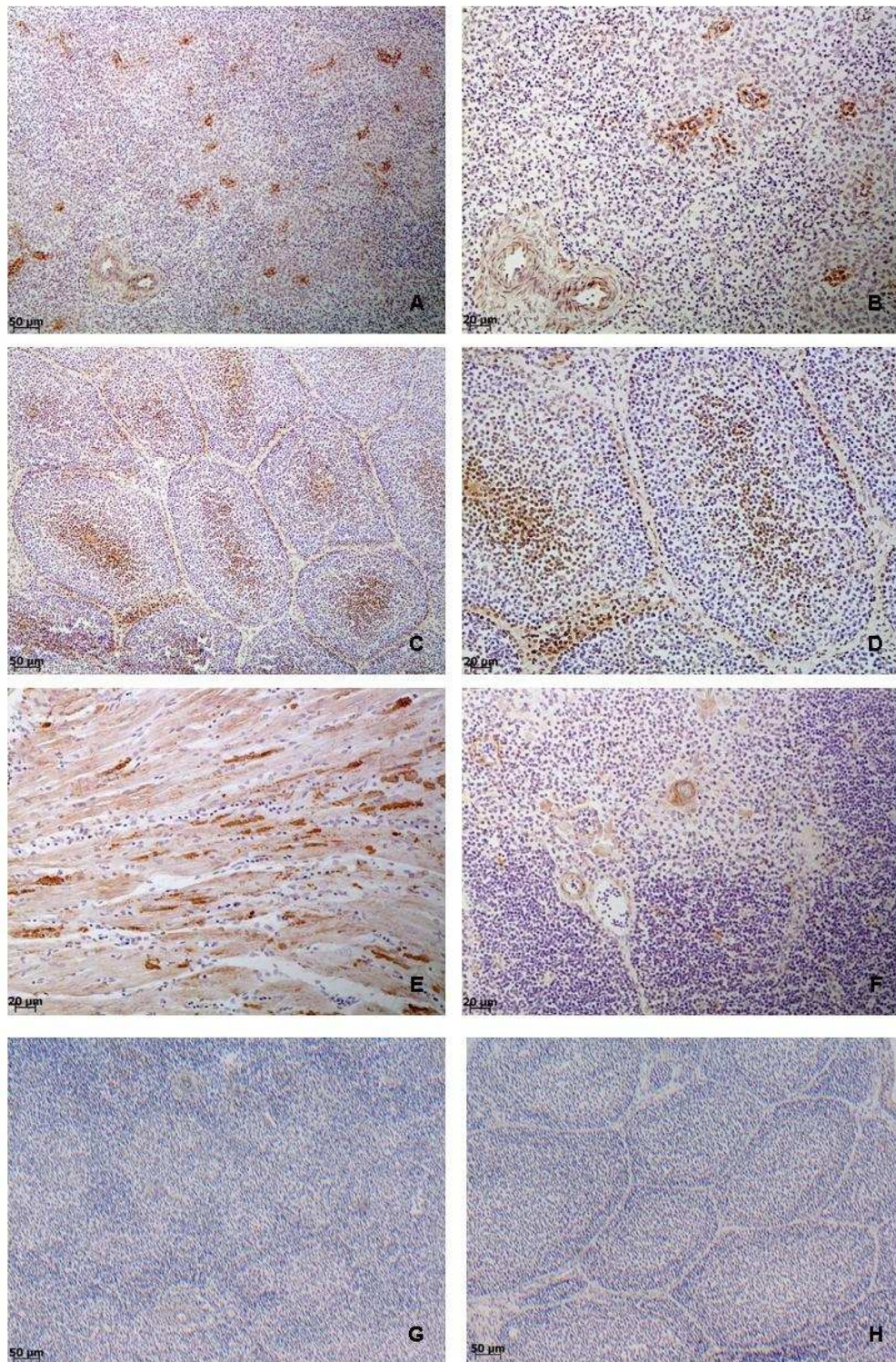


Abbildung 22: Expression von viralem Protein p19 in verschiedenen Organen

Am 14. Lebenstag wurden von RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und -chBAFF-Flag rv-transduzierten Tieren Organe zur Herstellung von Gefrierschnitten entnommen. Die Schnitte wurden nach Blockieren endogener Peroxidase mit dem gegen das Virusprotein p19 gerichteten Antikörper AMV-3C2 immunhistochemisch gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Schnitte von Milz (A, B), Bursa fabricii (C, D), Herzmuskel (E) und Thymus (F). In dem Versuch mitgeführte Kontrollschnitte untransfizierter Schnitte zeigten keine Färbung: Milz (G), Bursa fabricii (H).

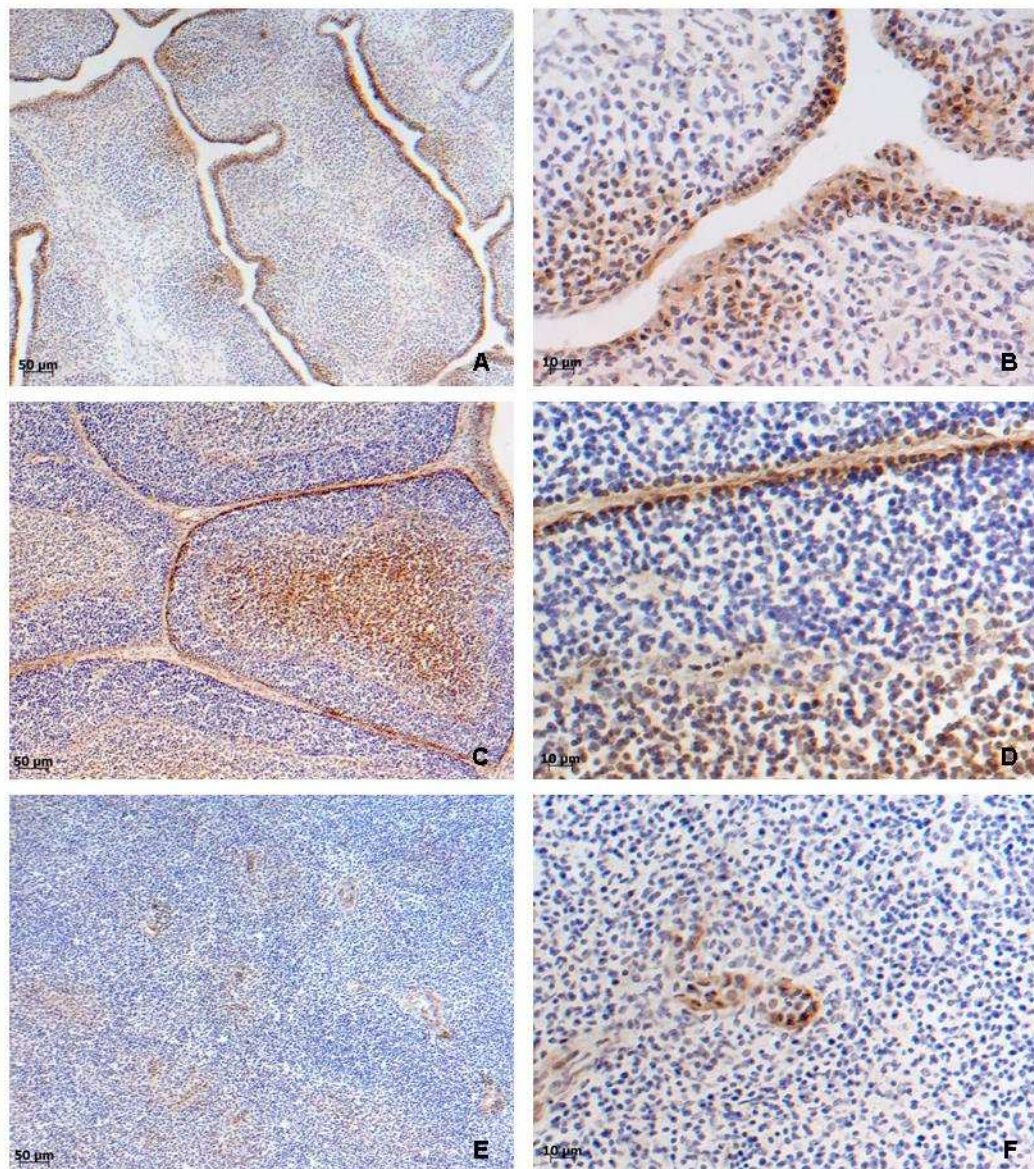


Abbildung 23: Expression von viralem Protein am Embryonaltag 18 und Tag 63

Zur Untersuchung der RCAS(BP)A-Expression an weiteren Zeitpunkten wurden Bursae fabricii am Embryonaltag 18 (A, B) und Tag 63 (C, D) sowie Milzen am Tag 63 (E, F) entnommen. Daraus hergestellte Gefrierschnitte wurden mit dem Antikörper AMV-3C2 gefärbt, welcher gegen das virale Protein p19 gerichtet ist. Auch in diesem Versuch waren Proben von untransduzierten Tieren negativ.

5.1.3.2 Untersuchungen zur Expression von chBAFF-Flag im Plasma

ChBAFF ist ein lösliches Zytokin. *In vitro*-Versuche haben gezeigt, dass RCAS(BP)A-basiertes chBAFF-Flag von transduzierten HEF in den Zellkulturüberstand sezerniert wird. Da in vorangegangenen Untersuchungen eine hohe Expression von viralem Protein in Gefäßen festgestellt werden konnte (siehe 5.1.2.2), wurde nun Plasma transduzierter Tiere gewonnen und auf den Gehalt an chBAFF-Flag analysiert.

Untersuchungen an Hühnern der Linie LSL

In einem ersten Versuch wurden LSL Embryonen mit RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und dem zugehörigen reversen Konstrukt transduziert. Nach dem Schlupf wurde über 63 Tage hinweg in regelmäßigen Abständen Blut entnommen und daraus Plasma gewonnen. Die Menge an chBAFF-Flag im Plasma wurde im beschriebenen ELISA (siehe 4.7.2.4) bestimmt. Als Kontrolle diente hierbei Plasma von den RCAS(BP)A-BAFF-Flag rv-transduzierten Tieren. Die Tierzahlen der RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten und der Kontrollgruppe waren elf bzw. sieben Tiere. Am Anfang der Versuchsphase gelang teilweise nicht, von allen Küken jede Woche Blut zu entnehmen, daher waren an den Tagen 4 und 19 nur 6 Tiere in der Kontrollgruppe. Da im Lauf des Versuchs Tiere verstarben, umfassten die Versuchsgruppen an den anderen Versuchstagen elf bzw. sechs Tiere (Tag 40), zehn bzw. fünf Tiere (Tag 54) sowie neun und fünf Tiere (Tag 62). Die Tiere verstarben auf Grund von Technopathien, welche nicht mit dem Tierversuch an sich im Zusammenhang stehen.

Es konnte ein deutlicher chBAFF-Flag Spiegel bei allen transduzierten Tieren beobachtet werden, doch zeigte sich, dass die Spiegel zwischen den einzelnen Tieren erheblich divergierten (siehe Abbildung 24). Jedoch konnte über die gesamte Versuchsdauer von 62 Tagen das RCAS(BP)A-basierte Protein nachgewiesen werden (siehe Abbildung 25). Der mittlere Spiegel nahmen bis zum elften Testtag zu, danach fiel er jedoch auf ein konstant bleibendes Niveau, das auch noch am 62. Tag erhalten war.

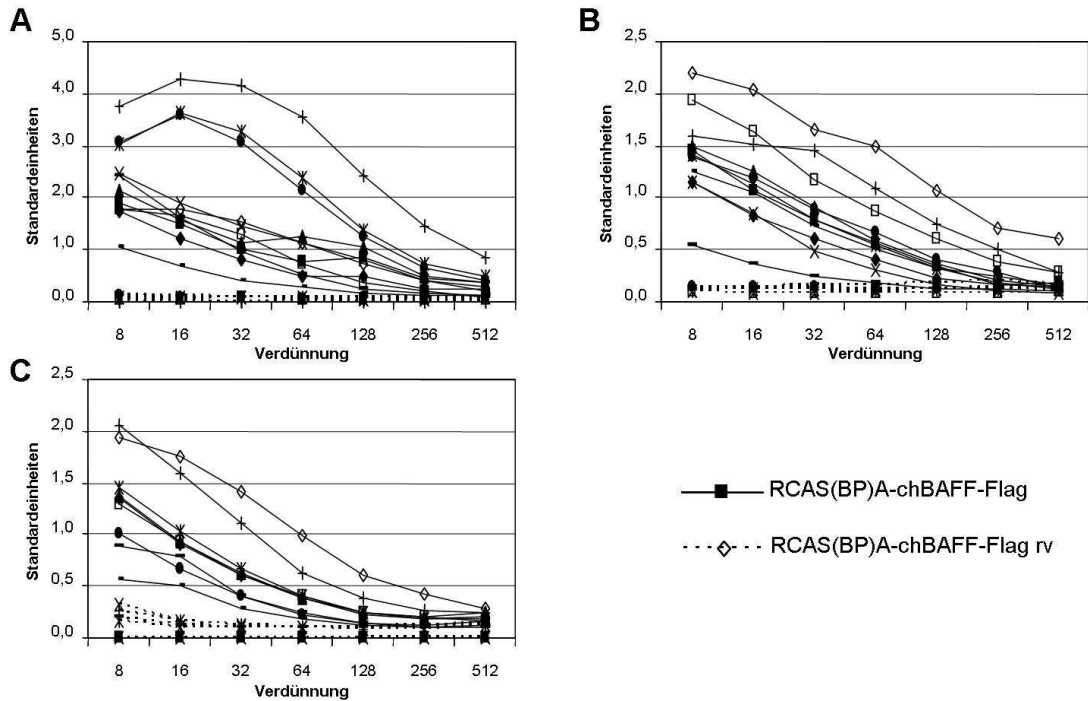


Abbildung 24: chBAFF-Flag-Expression in Hühnern der Linie LSL

RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierte Tiere wurden an den Tagen 4 (A), 33 (B) und 62 (C) Blut entnommen. Das jeweils daraus gewonnene Plasma wurde im ELISA auf chBAFF-Flag getestet. Die Spiegel wurden auf den mitgeführten chBAFF-Flag haltigen Standard-Zellkulturüberstand normalisiert.

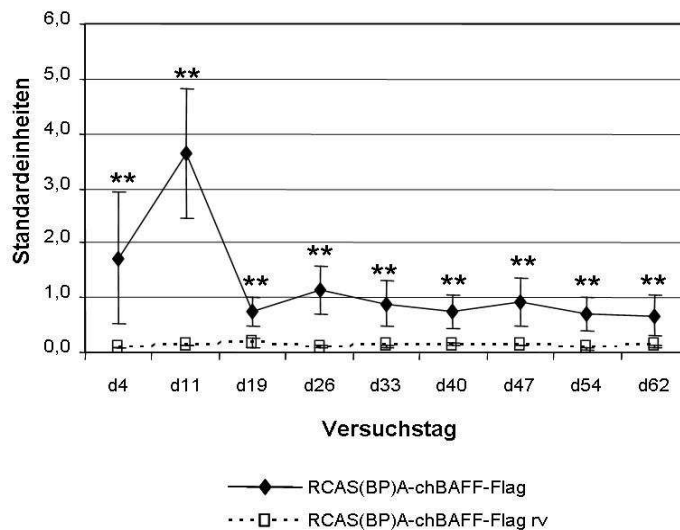


Abbildung 25: Verlauf der mittleren Expression von chBAFF-Flag in Hühnern der Linie LSL

Die Plasmaspiegel von RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierten Tieren wurden auf den mitgeführten Standard-Zellkulturüberstand normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte beider Gruppen \pm Standardabweichung. Mit ** gekennzeichnete Werte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf ($p < 0,01$).

Untersuchungen an Hühnern der Linie „0“

Da die Plasmaspiegel des RCAS(BP)A-basierten chBAFF-Flag Proteins in LSL Tieren auffallend divergierten, wurden in einem weiteren Versuch Hühner der Linie „0“ mit RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-Vektor ohne Insert transduziert. Am dritten und elften Lebenstag wurden Plasmaproben gewonnen, in welchen mittels des beschriebenen ELISAs (siehe 4.7.2.4) die Spiegel von chBAFF-Flag bestimmt wurden. Im Plasma aller RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten Tiere konnte das Protein nachgewiesen werden, während die Plasmen der Kontrolltiere negativ waren. Wie in Abbildung 26 gezeigt wird, divergierten die Spiegel der einzelnen Tiere weitaus weniger als im vorangegangenen Versuch mit LSL-Tieren.

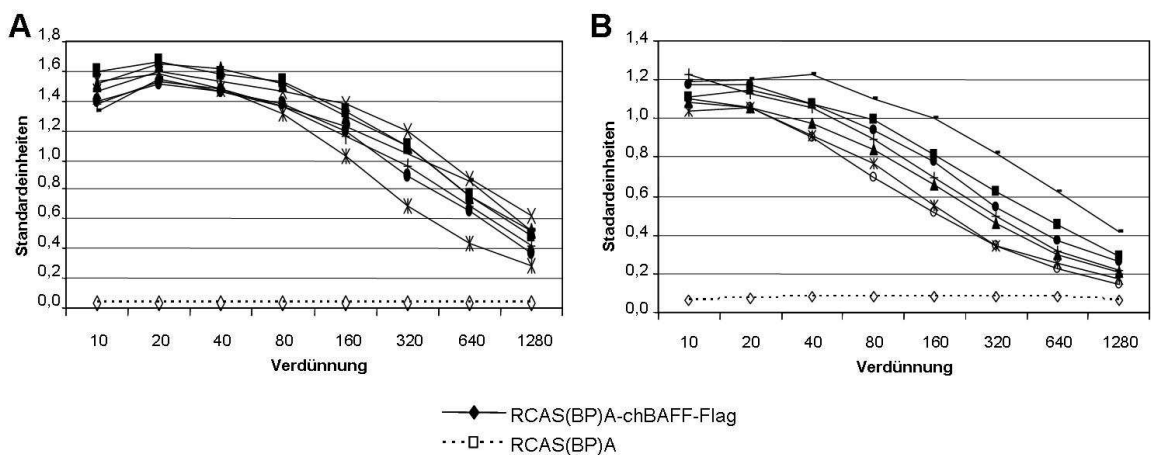


Abbildung 26: chBAFF-Flag-Expression in Hühnern der Linie „0“

Am dritten (A) und elften (B) Lebenstag wurde Plasma von RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-transduzierten Hühnern der Linie „0“ gewonnen im ELISA auf chBAFF-Flag-Spiegel getestet. Die Plasmaspiegel wurden auf den mitgeführten Standard-Zellkulturüberstand normalisiert.

5.1.4 Untersuchungen zur biologischen Aktivität des RCAS(BP)A-basierten Proteins

Da für funktionell-genomische Studien von Zytokinen mit Hilfe der RCAS-Gentransfertechnologie die Funktionalität des gebildeten Proteins essentiell ist, schlossen sich nun Versuche an, welche die biologische Aktivität des RCAS(BP)A-basierten Proteins chBAFF-Flag und des zugehörigen Decoy-

Faktors huBCMA-Fc zeigen sollten. Dieses System wurde gewählt, weil die Wirkung dieser Moleküle mit Hilfe rekombinanter Proteine in Küken schon untersucht worden war. ChBAFF ist ein wichtiger Faktor für das Überleben von Hühner-B-Zellen [13]. Injektion von rekombinantem chBAFF-Flag führte zu signifikant gesteigerten B-Zell-Frequenzen, wohingegen der lösliche Rezeptor huBCMA-Fc zu einer signifikanten Verminderung von B-Zellen führte. Erwähnte Untersuchungen beschränkten sich jedoch auf die ersten Lebensstage der Küken. In der vorliegenden Arbeit bestand nun erstmals die Möglichkeit eine eventuelle Wirkung von chBAFF-Flag an älteren Tieren zu analysieren.

Hierfür wurden verschiedene *in vivo*-Versuche mit Hühnern der Linie LSL durchgeführt. Embryonen wurden mit RCAS(BP)A-chBAFF-Flag, RCAS(BP)A-huBCMA-Fc sowie RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv als Kontrolle transduziert. Nach dem Schlupf wurden an verschiedenen Zeitpunkten zur durchflusszytometrischen Analyse von Leukozyten sowie zur Gewinnung von Plasma Blut entnommen. Zu den jeweiligen Versuchsenden wurden die Tiere betäubt und durch Blutentzug getötet und ihre Milzen zur Leukozytenpräparation gewonnen. Für immunhistologische Untersuchungen wurden zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten Organe von RCAS(BP)A-chBAFF-Flag, RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv und RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten Tieren entnommen.

5.1.4.1 Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chBAFF-Flag-Expression

Zunächst wurde die Wirkung von RCAS(BP)A-basierter chBAFF-Flag-Expression untersucht. Dieser Ansatz sollte als Modellsystem für eine RCAS(BP)A-vermittelte Überexpression eines Zytokins dienen. Hierfür wurden Hühner der Linie LSL mit RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und dem Kontrollvektor RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduziert. In einem Langzeitversuch wurde den Tieren in regelmäßigen Abständen Blut zur Präparation von Leukozyten und zur Plasmagewinnung entnommen.

RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierte wie auch Kontrolltiere zeigten keine klinischen Auffälligkeiten. Die Tierzahlen in der RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten und der Kontrollgruppe waren elf bzw. sieben Tiere. Da es jedoch

am Anfang der Versuchsphase teilweise nicht gelang, von allen Küken jede Woche Blut zu entnehmen, waren an den Tagen 4 und 19 nur 6 Tiere in der Kontrollgruppe. Im Lauf des Versuchs verstarben Tiere, daher umfassten an den anderen Versuchstagen die Gruppen elf bzw. sechs Tiere (Tag 40), zehn bzw. fünf Tiere (Tag 54) sowie neun und fünf Tiere (Tag 62). Die Tiere verstarben aus auf Grund von Technopathien, welche nicht mit dem Tierversuch an sich im Zusammenhang stehen.

Auswirkungen von chBAFF-Flag auf PBL

RCAS(BP)A-chBAFF-Flag sowie RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten Tieren wurde an den in Tabelle 12 genannten Zeitpunkten Blut entnommen. Nach Präparation der Leukozyten durch Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 4.2.1.2) schloss sich eine indirekte Doppelfärbung der Zellen an (4.8.2.1). Hier diente der Primärantikörper 16-6, welcher das Antigen CD45 erkennt, als Panleukozytenmarker. Als zweite Primärantikörper wurden AV20 und L-Kette zur Erkennung von B-Zellen und die Antikörper gegen CD3 und TCR-1, TCR-2 und TCR-3 zur Erkennung von T-Zellen eingesetzt. Abbildung 27 zeigt exemplarisch an einer 16-6/AV20-Färbung die Gating-Strategie zur Bestimmung der Frequenzen der verschiedenen Zellpopulationen.

ChBAFF-Flag-transduzierte Hühner zeigten im Vergleich zu den Kontrollen an den Tagen 11 und 26 signifikant erhöht B-Zell-Frequenzen im Blut, in den folgenden Untersuchungen war der Unterschied nicht mehr signifikant (siehe Tabelle 12). Den Unterschied an Tag 26 verdeutlicht Abbildung 28 mit repräsentativen B-Zell-Färbungen mit den Antikörpern 16-6 und AV20 eines RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und eines RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierten Tieres. Die T-Zell-Frequenzen beider Gruppen wiesen an den Tagen 11, 26 und 54 keine signifikanten Unterschiede auf. Am 40. Lebenstag der Tiere waren im Vergleich zu den Kontrolltieren in der Gruppe der chBAFF-Flag-transduzierten Tiere die CD3-positiven Zellen signifikant vermindert. In der parallel dazu durchgeführten Färbung mit Antikörpern gegen die T-Zell-Rezeptoren 1, 2 und 3 konnte jedoch keine signifikante Reduktion der T-Zellen beobachtet werden.

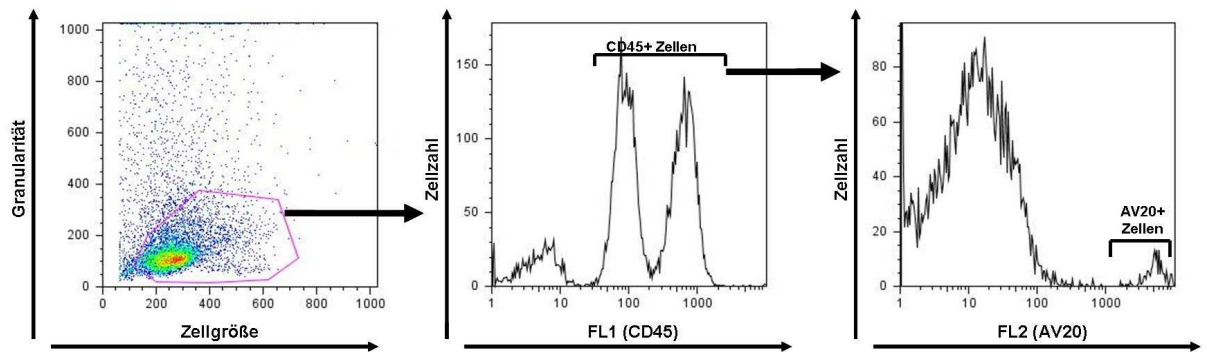


Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie einer Doppelfärbung von Blutleukozyten

Zunächst wurde die Lymphozytenpopulation an Hand der Größe und der Granularität der Zellen im DotPlot separiert. Dann wurden CD45-positive Lymphozyten im Histogramm der ersten Fluoreszenz gegatet. Aus dieser Population wurde schließlich in der zweiten Fluoreszenz die Population an AV20-positiven B-Zellen bestimmt.

	Gruppe	AV20	L-Kette	CD3	TCR-1 TCR-2 TCR-3
Tag 11	chBAFF-Flag	7,32 ± 4,32*	9,68 ± 5,84*	28,89 ± 6,01	29,31 ± 5,80
	chBAFF-Flag-rv	3,41 ± 1,13	4,51 ± 1,34	29,41 ± 12,42	36,97 ± 12,03
Tag 26	chBAFF-Flag	8,65 ± 2,67**	11,44 ± 3,06**	21,76 ± 7,16	31,19 ± 11,60
	chBAFF-Flag-rv	5,26 ± 2,27	6,72 ± 2,97	18,07 ± 3,08	29,51 ± 4,63
Tag 40	chBAFF-Flag	8,26 ± 3,56	15,98 ± 5,15	22,30 ± 6,66	31,27 ± 8,06
	chBAFF-Flag-rv	7,00 ± 3,36	10,30 ± 5,53	35,83 ± 10,40**	39,23 ± 11,09
Tag 54	chBAFF-Flag	7,20 ± 2,01	10,57 ± 3,95	28,27 ± 3,74	29,75 ± 4,46
	chBAFF-Flag-rv	5,71 ± 3,18	9,07 ± 4,18	27,32 ± 4,67	28,01 ± 2,78

Tabelle 12: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chBAFF-Flag-Expression auf Lymphozytenfrequenzen im Blut

Es erfolgte ein Vergleich zwischen RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierten Hühnern. Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden an den angegebenen Tagen PBL präpariert und in einer indirekten Doppelfärbung gefärbt. CD45 wurde als Panleukozytenmarker eingesetzt. Angegeben sind die Frequenzen der für die jeweiligen Antikörper-positiven Zellen an CD45-positiven Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellfrequenzen ± Standardabweichung.

Mit * gekennzeichnete Werte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf (für * $p < 0,05$, für ** $p < 0,01$).

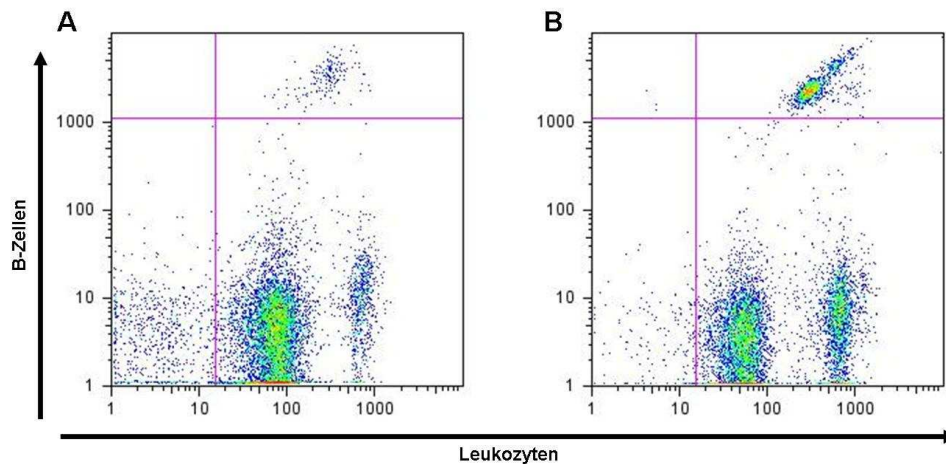


Abbildung 28: Exemplarische B-Zell Färbung eines RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierten und eines RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten Tieres am Tag 26

Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation präparierte Blutleukozyten eines RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv (A) und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag (B) transduzierten Tieres wurden nach einer indirekten Doppelfärbung mit den Antikörpern AV20 (aufgetragen auf der y-Achse) und CD45 (aufgetragen auf der x-Achse) durchflusszytometrisch analysiert. Doppelt positive Zellen im rechten oberen Quadranten stellen die B-Zell-Population dar.

Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chBAFF-Flag-Expression auf Milzleukozyten

Im nächsten Versuch wurde die Auswirkung von RCAS(BP)A-basierter chBAFF-Flag-Expression auf die Leukozytenzusammensetzung der Milz untersucht. Hierfür wurden Leukozyten aus Milzen von RCAS(BP)A-chBAFF-Flag sowie RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierten Tieren am Tag 14 und am Tag 63 präpariert. Diese wurden der, auch bei den Blutleukozyten durchgeführten, indirekten Doppelfärbung unterzogen. Bei den Milzen der RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten Gruppe vom Tag 14 konnte festgestellt werden, dass sie, verglichen mit den Organen der Kontrollgruppe, im Mittel eine signifikant erhöhte B-Zell-Frequenz aufwiesen (siehe Abbildung 29A). Wie in Abbildung 30 dargestellt spiegelte sich dieser Effekt auch in einem signifikant erhöhten Verhältnis von Milz- zu Gesamtkörpergewicht wieder. Am 63. Lebenstag konnte kein Unterschied der B-Zell-Frequenzen in den Milzen der beiden Tiergruppen beobachtet werden (siehe Abbildung 29B).

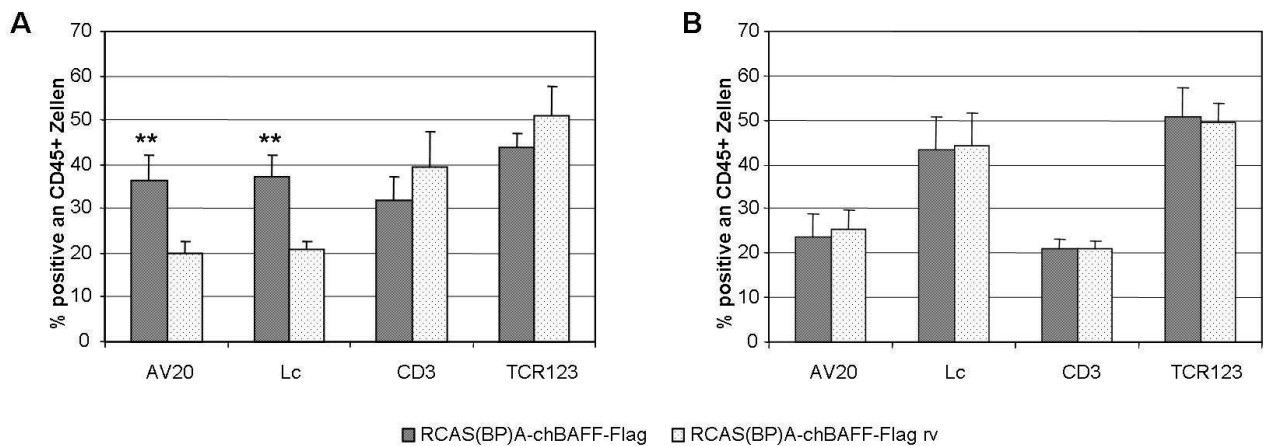


Abbildung 29: Auswirkungen der RCAS-basierten chBAFF-Flag-Expression auf Milzleukozyten
Milzen von RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierten Tieren wurden an den Tagen 14 (A, 4 bzw. 6 Tiere pro Gruppe) und 63 (B, 9 bzw. 5 Tiere pro Gruppe) zur Präparation von Leukozyten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation entnommen.

Es wurde eine indirekte Doppelfärbung und anschließend eine durchflusszytometrische Messung der Leukozytenfrequenzen durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Frequenzen der für die jeweiligen Antikörper-positiven Zellen an CD45-positiven Zellen. Mit ** gekennzeichnete Werte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf ($p < 0,01$).

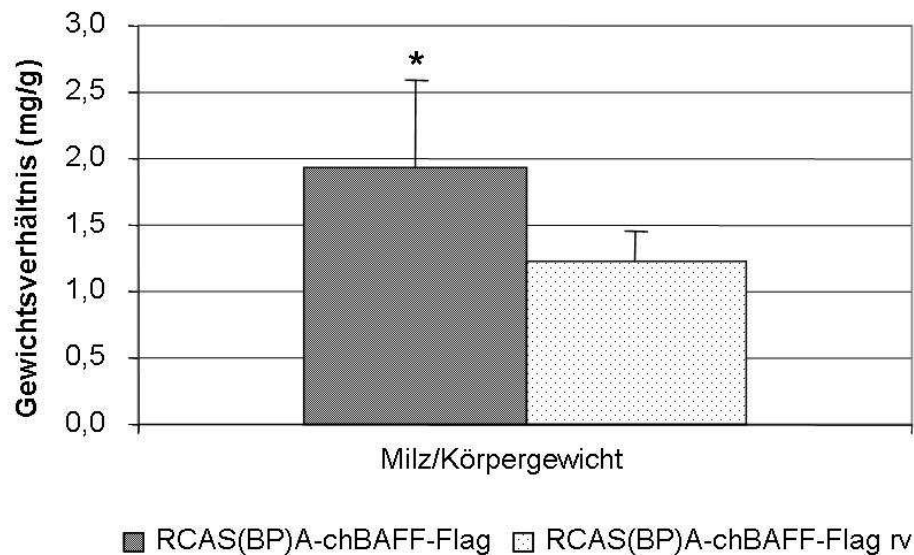


Abbildung 30: Auswirkung der RCAS-basierten chBAFF-Flag-Expression auf das Milzgewicht
Das Gewicht von Milzen RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierter Tiere wurde am 14. Lebenstag bestimmt. Es wurde ins Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gewichtsverhältnisse beider Tiergruppen.

Der signifikante Unterschied ist mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Auswirkungen von RCAS(BP)A-basierter chBAFF-Flag-Expression auf die Plasmaimmunglobulinspiegel

In einem zweimonatigen Versuch wurde RCAS(BP)A-chBAFF-Flag sowie RCAS(BP)A-BAFF-Flag rv-transduzierten Tieren wöchentlich Blut entnommen, daraus Plasma gewonnen und die Plasmaimmunglobulintiter bestimmt. Die Tiere wurden am 26. Lebenstag mit jeweils 50 µg KLH immunisiert und am 40. Lebenstag mit ebenfalls 50 µg KLH geboostert (siehe 4.6). Danach wurde auch KLH-spezifisches IgM und IgG im Plasma gemessen. Die Plasmaimmunglobulinspiegel der Tiere wurden mittels ELISA bestimmt (siehe 4.7.2.5). Bislang konnte die Wirkung von chBAFF-Flag auf die peripheren Antikörpertiter nur an Tieren im Alter bis zu 10 Tagen bestimmt werden [214]. Da Tiere dieser Altersgruppe jedoch noch kaum IgG und IgA bilden und noch hohe Spiegel an maternalem IgG aufweisen, konnte nur die Auswirkung auf IgM-Spiegel untersucht werden.

Plasmaspiegel von Gesamtimmunglobulinen

Rekombinant hergestelltes chBAFF-Flag führte in früheren Versuchen [214] zu einer Erhöhung von Plasma-IgM. Auch bei transduzierten Hühnern führte RCAS(BP)A-basiertes chBAFF-Flag, verglichen mit der Kontrollgruppe, zu signifikant erhöhten IgM-Spiegeln (siehe Abbildung 31A). Dieser Effekt konnte bis zum 47. Tag des zweimonatigen Versuchs beobachtet werden. Wie Abbildung 31B zeigt, konnte zudem festgestellt werden, dass die chBAFF-Flag Gruppe über fast den gesamten Versuchszeitraum signifikant höhere IgA-Spiegel im Plasma aufwies als die Kontrollgruppe. Ein Einfluss von RCAS(BP)A-basiertem chBAFF-Flag auf die IgG-Spiegel der Tiere konnte nur an den Tagen 26, 33 und 47 beobachtet werden (siehe Abbildung 31C).

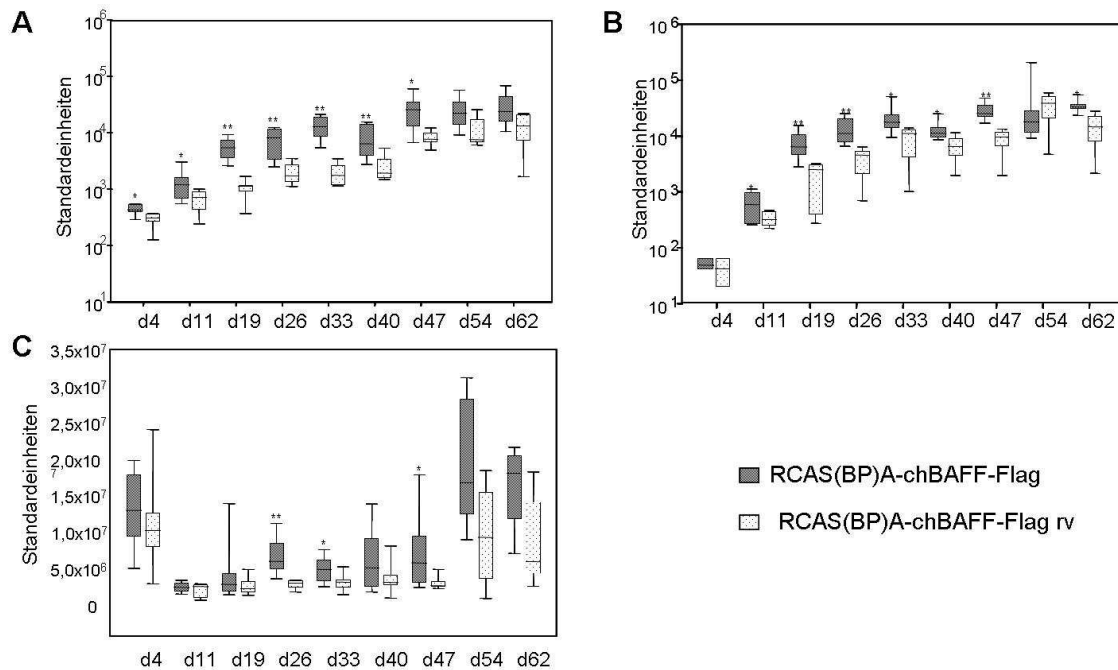


Abbildung 31: Auswirkungen von RCAS(BP)A-basiertem chBAFF-Flag auf Plasmaimmunglobulinspiegel

RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierten Tieren wurde an den angegebenen Zeitpunkten Blut zur Plasmagewinnung entnommen, welches als Probe im ELISA eingesetzt wurde. Es wurde jeweils ein Sandwich-ELISA zum Nachweis von IgM (A), IgA (B) und IgG (C) durchgeführt. Die Werte beider Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind im Box-Whisker-Plot dargestellt.

KLH-spezifisches Plasmaimmunglobulin

Wie oben bereits erwähnt, wurden die Tiere im beschriebenen *in vivo*-Versuch an den Tagen 26 und 40 mit dem Antigen KLH immunisiert. Die Spiegel des daraufhin gebildeten antigenspezifischen IgM und IgG wurden im ELISA bestimmt (siehe 4.7.2.6). Hierbei konnten, wie in Abbildung 32A gezeigt, zeitweise signifikant erhöhte Spiegel von KLH-spezifischem IgM beobachtet werden. Antigenspezifisches IgG differierte nicht zwischen RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten und Kontrolltieren (siehe Abbildung 32B).

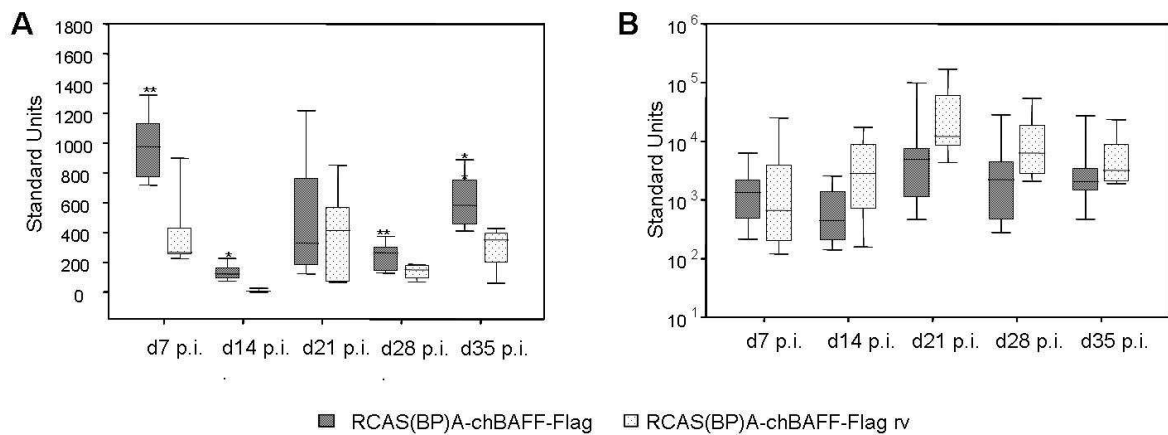


Abbildung 32: Spiegel von KLH-spezifischem Plasmainmoglobulin

RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierte Tiere wurden am 26. und 40. Lebenstag mit jeweils 50 µg KLH intraperitoneal immunisiert. Die Darstellung der Plasmaspiegel von KLH-spezifischem IgM (A) und IgG (B) erfolgt im Box-Whisker-Plot.

Immunhistologische Untersuchungen

Anschließend erfolgte eine histologische Untersuchung der Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chBAFF-Flag-Expression auf Bursa fabricii und Milz. Hierfür wurden Organe von 14 sowie 63 Tage alten RCAS(BP)A-chBAFF-Flag und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierten Tieren gewonnen. Diese wurden mit dem Antikörper Bu1 gefärbt, welcher gegen das Antigen chB6 auf Hühner B-Zellen gerichtet ist. Hierbei konnten weder in Milzen noch in Bursae fabricii histologisch erkennbare Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (siehe Abbildung 35).

5.1.4.2 Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten huBCMA-Fc-Expression

Um auch die Möglichkeit eines funktionellen knockdowns mit Hilfe der RCAS-Technologie untersuchen zu können, wurden Tiere mit dem chBAFF-bindenden huBCMA-Fc-transduziert.

Auswirkungen von huBCMA-Fc auf PBL

In einem dazu durchgeführten *in vivo*-Versuch wurden am 8. und 16. Lebenstag

Blutproben von RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten Tieren und unbehandelten Kontrollen gewonnen und daraus Leukozyten präpariert (siehe 4.2.1.2). Diese wurden nach einer indirekten Antikörperfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Ein gegen CD45 gerichteter Antikörper wurde zur Erkennung der Gesamtleukozyten eingesetzt. Zusätzlich wurden die Antikörper AV20, L-Kette und M1 zur Erkennung von B-Zellen sowie die Antikörper gegen CD3 und TCR-1, TCR-2 und TCR-3 zur Erkennung von T-Zellen eingesetzt. Das Gating erfolgte analog zum in 5.1.4.1 beschriebenen Versuch (siehe Abbildung 27). In Abbildung 33 sind exemplarisch je eine B-Zell-Färbung (16-6/AV20) von einem RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten und einem Kontrolltier dargestellt.

Die Gruppe der RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten Tiere wies zu beiden Zeitpunkten signifikant erniedrigte Frequenzen an Bu1, L-Kette und M1-positiven Zellen auf (siehe Tabelle 13). Dieser Effekt war so zu erwarten, da auch in Versuchen mit rekombinant hergestelltem huBCMA-Fc eine Reduktion der B-Zell-Zahlen im Blut zu beobachten war. Somit konnte die Funktionalität von RCAS(BP)A-basiertem huBCMA-Fc nachgewiesen werden.

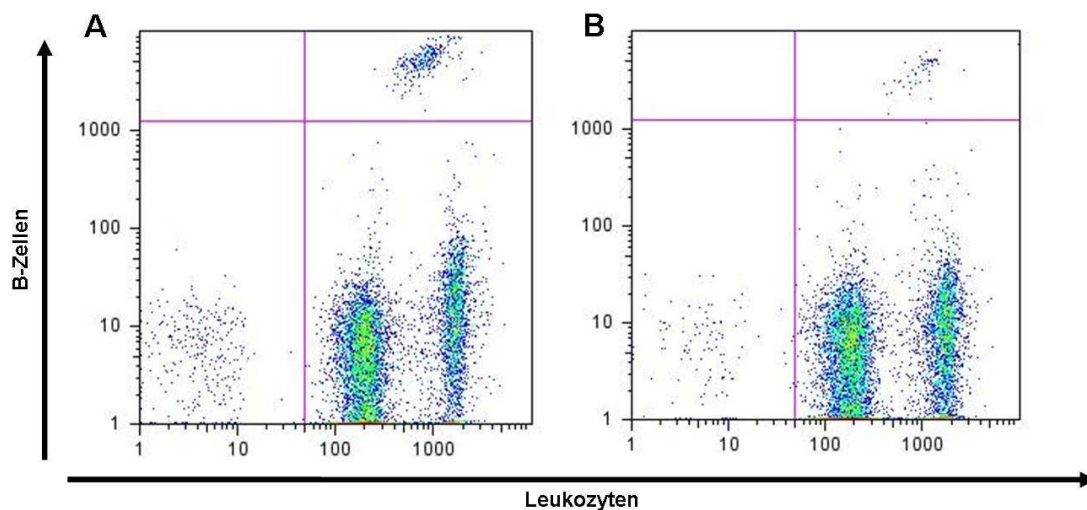


Abbildung 33: B-Zell-Färbung eines RCAS(BP)A-huBCMA-transduzierten und eines Kontrolltieres (exemplarisch)

Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden Blutleukozyten von RCAS(BP)A-huBCMA sowie unbehandelten Kontrolltieren präpariert und nach einer indirekten Doppelfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Färbung eines Kontrolltieres (A) und eines RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten Tieres (B). Auf der x-Achse ist die Fluoreszenz CD45-positiver Zellen (Leukozyten) zu sehen. Auf der y-Achse ist die Fluoreszenz AV20-positiver Zellen aufgetragen. Im rechten oberen Quadranten sind doppelt positive B-Zellen zu erkennen.

	Gruppe	AV20	L-Kette	M1	CD3	TCR-1 TCR-2 TCR-3
Tag 8	huBCMA-Fc	0,53 ± 0,42**	1,16 ± 0,34**	0,53 ± 0,39**	23,09 ± 5,71	22,65 ± 4,40
	Kontrolle	2,87 ± 0,53	3,94 ± 0,31	3,19 ± 0,76	19,09 ± 3,95	18,09 ± 2,92
Tag 16	huBCMA-Fc	0,51 ± 0,42**	1,28 ± 0,37**	0,56 ± 0,39**	23,74 ± 5,76	22,70 ± 4,46
	Kontrolle	2,86 ± 0,52	4,12 ± 0,32	3,22 ± 0,75	19,74 ± 4,07	17,91 ± 3,06

Tabelle 13: Auswirkungen der RCAS-basierten huBCMA-Fc-Expression auf Lymphozytenfrequenzen im Blut

Jeweils sechs RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten und unbehandelten Tieren wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Blut entnommen, woraus mittels Dichtegradienten-Zentrifugation PBL präpariert wurden. Diese wurden nach einer indirekten Doppelfärbung im Durchflusszytometer gemessen. Ein Antikörper gegen CD45 wurde als Panleukozytenmarker eingesetzt. Angegeben sind die Frequenzen der für die jeweiligen Antikörper-positiven Zellen an CD45-positiven Leukozyten.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellfrequenzen ± Standardabweichung.

Mit * gekennzeichnete Werte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf (für * $p < 0,05$, für ** $p < 0,01$).

Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten huBCMA-Fc-Expression auf Milzleukozyten

Zusätzlich zu den Untersuchungen der PBL wurde auch die Auswirkung der RCAS(BP)A-basierten Zytokin-Hemmung auf die Zusammensetzung der Milzleukozyten untersucht. Hierfür wurden in einem weiteren Versuch am 16. Lebenstag Milzen von RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten und untransduzierten Kontrolltieren gewonnen (siehe 4.2.1.3). Nach Präparation der Leukozyten erfolgte wiederum eine indirekte FACS-Färbung, bei der der anti-CD45-Antikörper

16-6 als Leukozytenmarker benutzt wurde. Als zweite Antikörper wurden Bu1, anti-L-Kette, anti-CD3 oder ein Gemisch aus anti-TCR-1, anti-TCR-2 und anti-TCR-3 benutzt.

Auch hier konnte eine Auswirkung des knockdowns von chBAFF im Hühnerorganismus beobachtet werden. Wie in Abbildung 34 gezeigt ist, enthielten Milzen von RCAS(BP)A-huBCMA-Fc transduzierten Hühnern einen signifikant erniedrigten Anteil von B-Zellen an den gesamten Milzleukozyten. Die T-Zell-Frequenzen in dieser Gruppe waren signifikant erhöht (siehe Abbildung 34). Abbildung 34B zeigt, dass der Anteil der Leukozyten (CD45-positiv) in der RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten Gruppe nicht signifikant erniedrigt war.

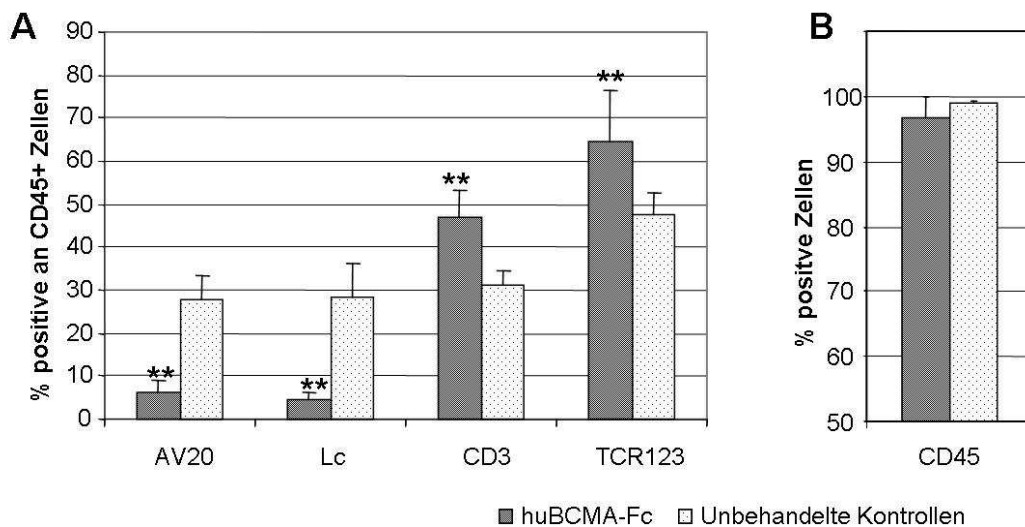


Abbildung 34: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten huBCMA-Fc-Expression auf Milzleukozyten

Im Alter von 16 Tagen wurden von RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten Tieren sowie einer unbehandelten Kontrollgruppe Milzen für die Präparation von Leukozyten entnommen. Nach einer indirekten Doppelfärbung der Zellen wurden diese im Durchflusszytometer analysiert.

A: Dargestellt sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Frequenzen der für die jeweiligen Antikörper-positiven Zellen an CD45-positiven Zellen.

Mit ** gekennzeichnete Werte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf ($p < 0,01$)

B: Anteil der CD45-positiven Zellen an den Milzzellen. Gezeigt sind die Mittelwerte beider Gruppen (\pm Standardabweichung).

Histologische Untersuchungen

Zum histologischen Nachweis der Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten huBCMA-Fc-Expression wurden in weiteren *in vivo*-Versuchen Tiere mit RCAS(BP)A-huBCMA-Fc und dem Kontrollkonstrukt RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduziert.

Es wurde untersucht, ob die Expression von RCAS(BP)A-basiertem huBCMA-Fc

histologische Veränderungen in Bursa fabricii und Milz bewirkt. Hierzu wurden einerseits die Bursae fabricii von Hühnerembryonen am Embryonaltag 18 gewonnen. Andererseits wurden Milzen sowie Bursae fabricii am 16 Lebenstag entnommen. Die daraus angefertigten Gefrierschnitte (Methode siehe 4.9.2 und 4.9.4) wurden nach Blockieren endogener Peroxidase mit dem Antikörper Bu1 gefärbt, welcher an das B-Zell-Antigen chB6 bindet.

In Abbildung 36 sind jeweils repräsentative Schnitte dieser Färbungen abgebildet. Die Bursae fabricii RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierter Tiere wiesen im Vergleich zu denen RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierter Kontrolltiere sowohl vor dem Schlupf (A-D) als auch im Alter von 16 Tagen (E, F) eine dramatische Reduktion von B-Zellen auf. Wie in den Abbildungen A und C deutlich wird, werden zwar Follikelstrukturen angelegt, welche aber teilweise keine B-Zellen enthalten. Auch in der Milz führte RCAS(BP)A-basiertes huBCMA-Fc zu einer deutlichen Reduktion Bu1-positiver Zellen (Abbildung 36 G, H). Die typische Anordnung der B-Zell um T-Zell-Zonen herum war in den RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten Tieren weitgehend nicht erkennbar.

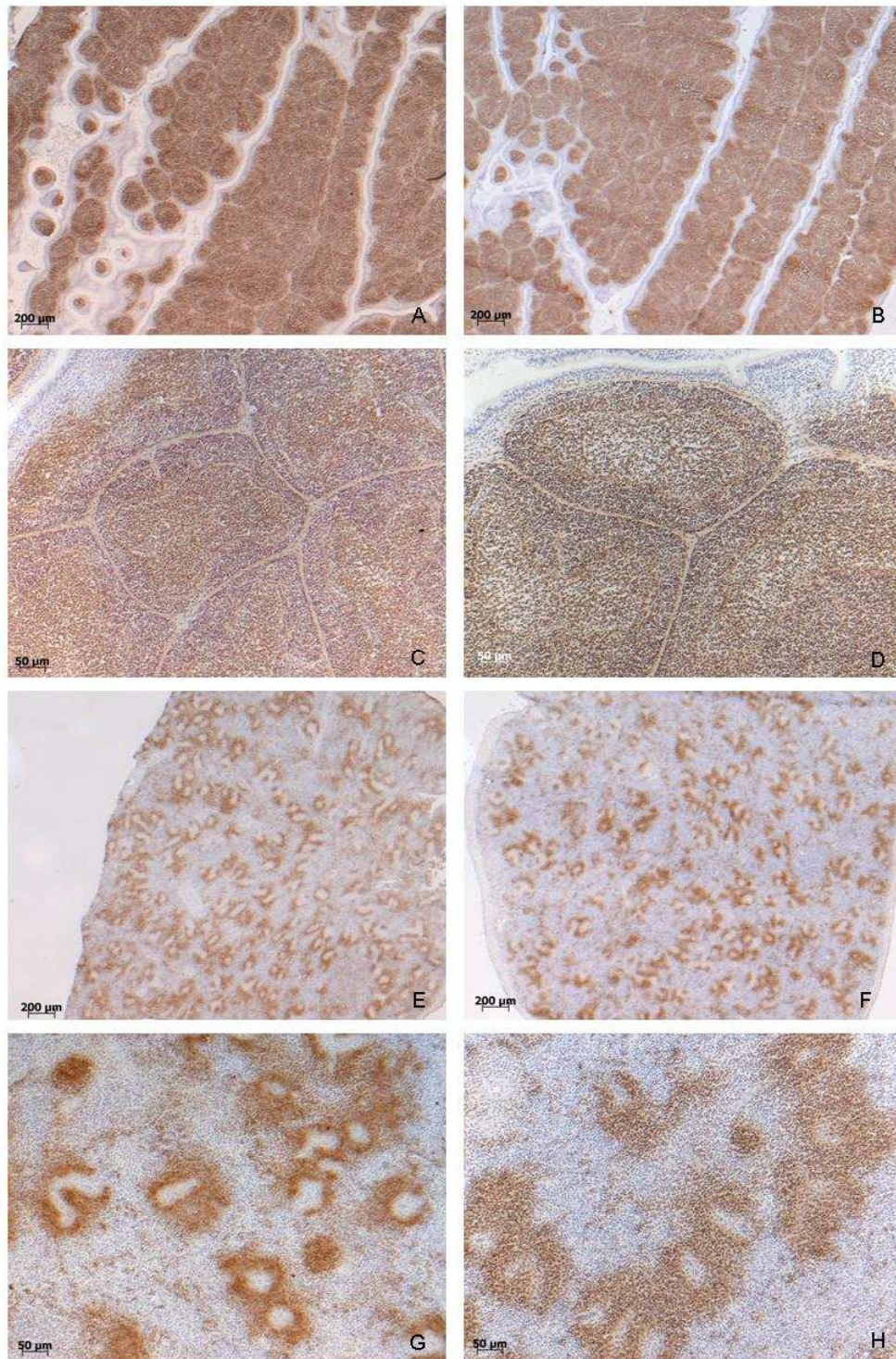


Abbildung 35: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chBAFF-Flag-Expression, Histologie von Bursa fabricii und Milz

Bursae fabricii (A-C) und Milzen (E-F) RCAS(BP)A-chBAFF-Flag- rv (links) und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierter Tiere (rechts) wurden an den Tagen 14 (A, B sowie E, F) und 63 (C, D sowie G, H) entnommen. Daraus hergestellte Gefrierschnitte wurden mit dem gegen chB6 gerichteten Antikörper Bu1 histologisch gefärbt. Im Anschluss erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun. Aus beiden Gruppen sind repräsentative Färbungen abgebildet.

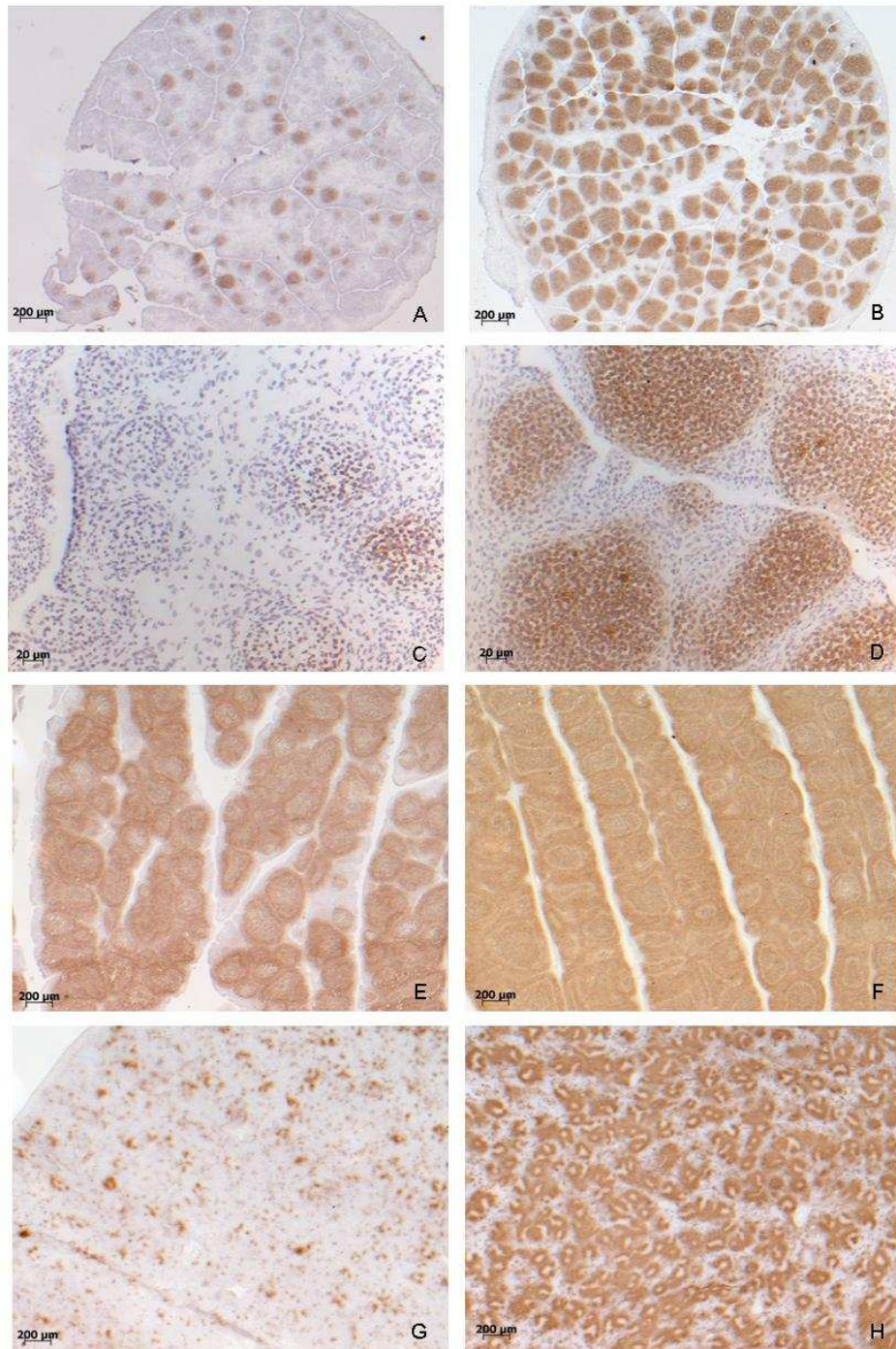


Abbildung 36: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten huBCMA-Fc-Expression, Histologie von Bursa fabricii und Milz

Bursae fabricii und Milzen RCAS(BP)A-huBCMA und RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierter Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und zur Herstellung von Gefrierschnitten verwendet. Alle Schnitte wurden mit dem Antikörper Bu1 gefärbt, welcher gegen das B-Zell Antigen chB6 gerichtet ist. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hämalun gegengefärbt. Links sind jeweils repräsentative Bilder RCAS(BP)A-huBCMA-transduzierter Tiere abgebildet, rechts Bilder der RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduzierten Kontrollgruppe.

Die Bilder A-D zeigen Aufnahmen von Bursae fabricii am Embryonaltag 18. In den Bildern E und F sind am Tag 16 entnommene Bursae fabricii abgebildet. Die Abbildungen G und H zeigen am Tag 16 entnommene Milzen.

5.1.5 Auswirkungen der RCAS(BP)A-Expression auf Leukozytenfrequenzen in Blut und verschiedenen Organen

Die biologische Aktivität von RCAS(BP)A-basiertem Protein konnte in den vorangegangenen Versuchen aufgezeigt werden. Da bei der Verwendung der RCAS-Gentransfertechnologie jedoch replikationskompetentes Virus eingesetzt wird, sollte nun untersucht werden, wie sich das Virus auf den Organismus der Tiere auswirkt. Hierfür wurden Hühner der Linie LSL mit leerem RCAS(BP)A-Vektor transduziert und mit einer untransduzierten Kontrollgruppe verglichen.

Auswirkungen auf Leukozytenfrequenzen im Blut

Wie in den vorangegangenen Versuchen wurde den Tieren über längere Zeit Blut zur Leukozytenisolierung (siehe 4.2.1.2) und anschließenden durchflusszytometrischen Analyse (Färbung siehe 4.8.2.1 und 4.8.2.2) entnommen.

Tabelle 14 zeigt die entsprechenden Leukozytenfrequenzen beider Versuchsgruppen. Es fiel auf, dass RCAS(BP)A-transduzierte Tiere gegenüber unbehandelten Kontrollen an den Tagen 24, 31, 46 sowie 73 signifikant erhöhte B-Zell-Frequenzen im Blut aufwiesen. Am Tag 24 zeigte die Gruppe der untransduzierten Tiere eine signifikante Erhöhung der K1-positiven Leukozyten (Thrombozyten).

	Gruppe	AV20	L-Kette	CD3	TCR-1 TCR-2 TCR-3	K1	Kul01
Tag 10	RCAS	2,23 ± 1,40	2,82 ± 1,77	19,03 ± 6,30	18,54 ± 6,89	63,27 ± 8,63	3,22 ± 1,55
	untransduziert	1,78 ± 0,89	1,96 ± 0,95	18,10 ± 7,65	18,47 ± 7,60	61,29 ± 16,39	2,99 ± 0,74
Tag 24	RCAS	4,40 ± 1,42*	6,48 ± 2,19	33,14 ± 12,47	34,76 ± 12,63	42,24 ± 17,34*	2,13 ± 1,52
	untransduziert	3,50 ± 0,75	8,04 ± 1,94	37,21 ± 7,74	38,19 ± 8,18	21,63 ± 7,27	2,57 ± 0,74
Tag 31	RCAS	6,87 ± 1,39*	7,91 ± 0,49**	26,29 ± 4,69	27,35 ± 4,98	54,98 ± 3,93	1,12 ± 0,42
	untransduziert	4,56 ± 1,28	5,50 ± 1,06	23,43 ± 3,87	24,75 ± 3,92	54,75 ± 7,10	1,55 ± 1,10
Tag 46	RCAS	5,64 ± 1,03**	7,81 ± 0,59**	24,83 ± 2,96	28,24 ± 2,35	57,15 ± 1,66	1,95 ± 0,30
	untransduziert	3,33 ± 0,67	4,67 ± 0,82	23,04 ± 3,47	26,14 ± 3,52	59,33 ± 4,29	2,25 ± 1,35
Tag 73	RCAS	6,58 ± 0,99**	10,00 ± 3,98	30,50 ± 7,06	33,31 ± 7,69	50,43 ± 12,63	1,89 ± 0,56
	untransduziert	3,99 ± 0,97	7,12 ± 1,58	25,97 ± 3,08	28,78 ± 3,49	56,85 ± 5,90	1,70 ± 1,05

Tabelle 14: Leukozytenfrequenzen im Blut von RCAS-transduzierten und untransduzierten Hühnern der Linie LSL

An den angegebenen Tagen wurden Leukozyten präpariert und nach einer indirekten Doppel- bzw. Dreifachfärbung im Durchflusszytometer analysiert. Antikörper gegen CD45 (16-6 und LT40) wurden hierbei als Panleukozytenmarker eingesetzt. Angegeben sind die Frequenzen der für die jeweiligen Antikörper-positiven Zellen an CD45-positiven Leukozyten.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellfrequenzen ± Standardabweichung.

Mit * gekennzeichnete Werte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf (für * $p < 0,05$, für ** $p < 0,01$).

Analyse von absoluten Zellzahlen in Vollblut

Am Tag 73 wurde mit Hilfe der von Seliger et al. entwickelten Methode die absolute Zellzahl einzelner Leukozytenpopulationen im Vollblut bestimmt [274].

Hierbei ergab sich, dass die RCAS(BP)A-transduzierte Gruppe eine signifikant erhöhte absolute B-Zellzahl aufwies. Für T-Zellen (CD3), Thrombozyten (K1) und myeloide Zellen (Kul01) konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden.

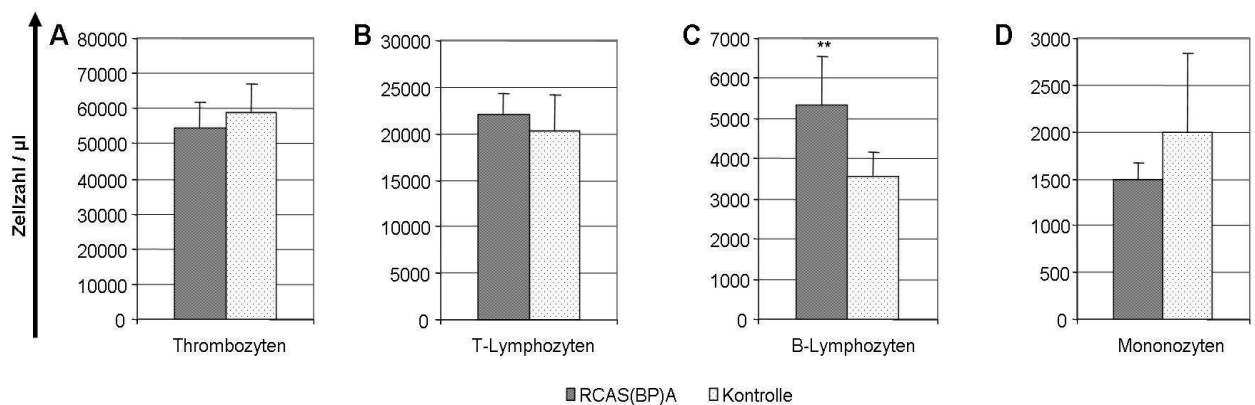


Abbildung 37: Absolute Quantifizierung von Leukozytenpopulationen RCAS(BP)A-transduzierter und unbehandelter Hühner am Tag 73

Aus dem Vollblut von vier RCAS(BP)A-transduzierten Tieren und sieben unbehandelten Kontrolltieren wurden mit Hilfe einer direkten Antikörperfärbung in Beads enthaltenden TruCount®Tubes die absoluten Zellzahlen pro µl Blut bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen \pm Standardabweichung.

Mit ** gekennzeichnete Werte weisen signifikante Unterschiede auf ($p < 0,01$).

Auswirkungen auf Leukozytenfrequenzen in verschiedenen Organen

Am 74. Lebenstag wurden die Tiere betäubt, durch Blutentzug getötet und Organproben von Milz, Thymus und Knochenmark gewonnen. Auch hieraus wurden Leukozyten gewonnen (siehe 4.2.1.3) und nach einer indirekten Doppel- und Dreifachfärbung (siehe 4.8.2.1 und 4.8.2.2) im Durchflusszytometer analysiert. Die verwendeten Antikörper sind in Abbildung 38, Abbildung 39 und Abbildung 40 aufgeführt.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Milzleukozyten zeigte sich, dass RCAS(BP)A-transduzierte Tiere erhöhte Frequenzen an positiven Zellen in den Färbungen mit den Antikörpern gegen die leichte Kette des Hühnerimmunglobulinmoleküls hatten (B-Zellen). Die Färbung gegen das B-Zell-Antigen chB6 mit dem Antikörper AV20 zeigte jedoch keinen signifikanten

Unterschied. Zudem zeigten die Tiere der RCAS(BP)A-transduzierten Gruppe im Mittel mehr myeloide Zellen (Kul01) (siehe Abbildung 38).

Bei der Färbung von Knochenmarksleukozyten waren keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu beobachten (siehe Abbildung 39). Auch eine Färbung von T-Zellen aus dem Thymus gegen die Antigene CD4 und CD8 wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (siehe Abbildung 40).

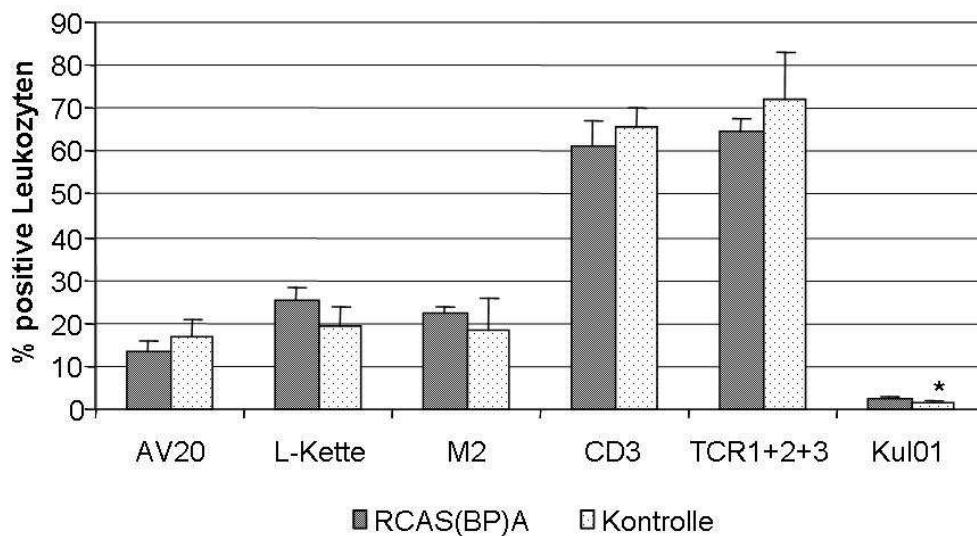


Abbildung 38: Auswirkungen des Vektors RCAS(BP)A auf Milzleukozyten

Die Milzen von vier RCAS(BP)A-transduzierten sowie sieben untransduzierten Tieren wurden am 74. Lebenstag zur Präparation von Leukozyten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation entnommen. Nach einer indirekten Doppel- bzw. Dreifachfärbung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Es sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Frequenzen der für die jeweiligen Antikörper-positiven Zellen an CD45-positiven Zellen angegeben.

Mit * gekennzeichnete Werte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf (für * $p < 0,05$, für ** $p < 0,01$).

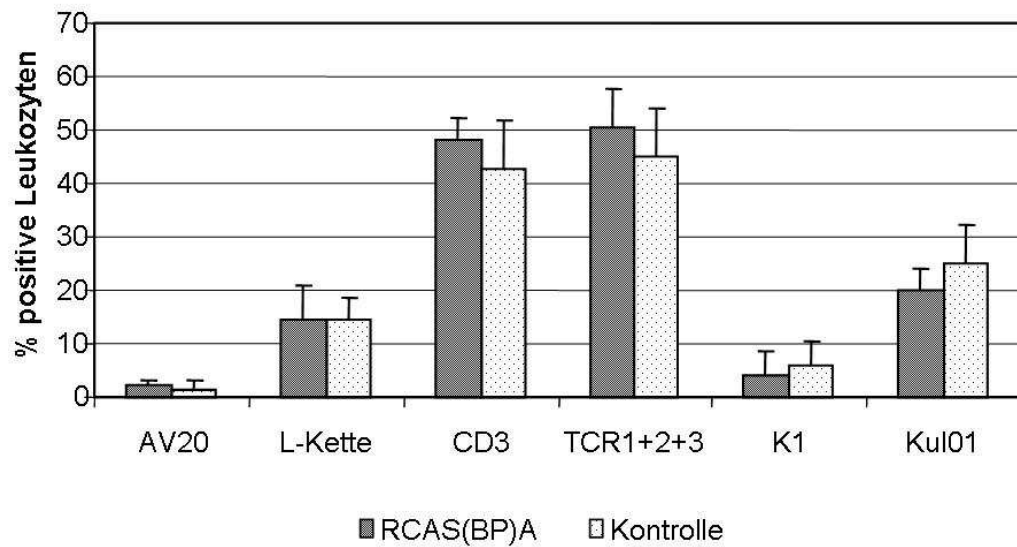


Abbildung 39: Auswirkungen des Vektors RCAS(BP)A auf Leukozyten des Knochenmarks
 Von vier RCAS(BP)A-transduzierten und sieben untransduzierten Tieren wurden am 74. Lebenstag Knochenmarkszellen gewonnen. Nach einer indirekten Doppel- bzw. Dreifachfärbung der Zellen wurden diese durchflusszytometrisch analysiert. Es sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Frequenzen der für die jeweiligen Antikörper-positiven Zellen an CD45-positiven Zellen angegeben.

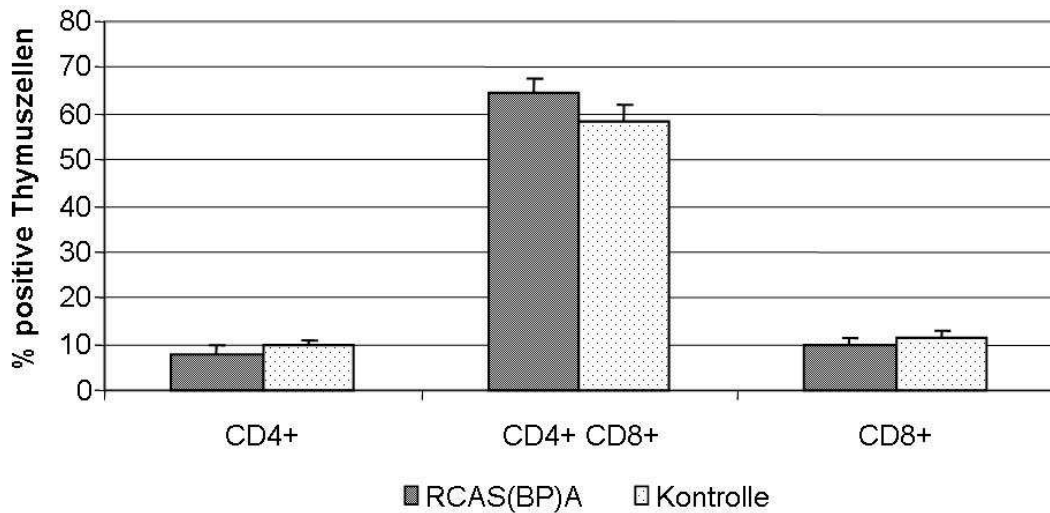


Abbildung 40: Auswirkungen von RCAS(BP)A auf Thymuszellen
 Von vier RCAS(BP)A-transduzierten Tieren und sieben unbehandelten Kontrollen wurden am 74. Lebenstag mittels Dichtegradienten-Zentrifugation Thymuszellen gewonnen und nach einer indirekten Färbung mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der untersuchten Gruppen \pm Standardabweichung.

5.2 *In vivo*-Untersuchungen zum CD40/CD40L-System beim Haushuhn

In den vorangegangenen Versuchen war das RCAS-Gentransfersystem für *in vivo*-Untersuchungen beim Haushuhn etabliert worden. Es erwies sich auf Grund der Ergebnisse besonders für lösliche Proteine als geeignet. Nun sollte im zweiten Teil dieser Arbeit ein weiteres Zytokinsystem des Haushuhns *in vivo* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde das CD40/CD40-Ligand-System ausgewählt. Einerseits sollte so die Anwendbarkeit der RCAS-Technologie in einem zweiten System gezeigt werden. Andererseits sollten die bereits vorhandenen Informationen zur Funktion des CD40/CD40L-Systems aus *in vitro*-Studien [174] durch *in vivo*-Untersuchungen ergänzt werden.

Um mehr über die Funktion des CD40/CD40-Ligand-Systems beim Huhn *in vivo* zu erfahren wurde der Weg eines funktionellen knockdown des chCD40L gewählt. Da in den vorangegangenen Versuchen bereits der knockdown endogenen chBAFFs mittels des löslichen Rezeptors huBCMA-Fc erfolgreich war, sollte nun ein lösliches chCD40-huFc-Fusionsprotein exprimiert werden. Dieses sollte an den chCD40L binden und somit die Interaktion von B- und T-Zelle über chCD40 und seinen Rezeptor zu verhindern (siehe Abbildung 41).

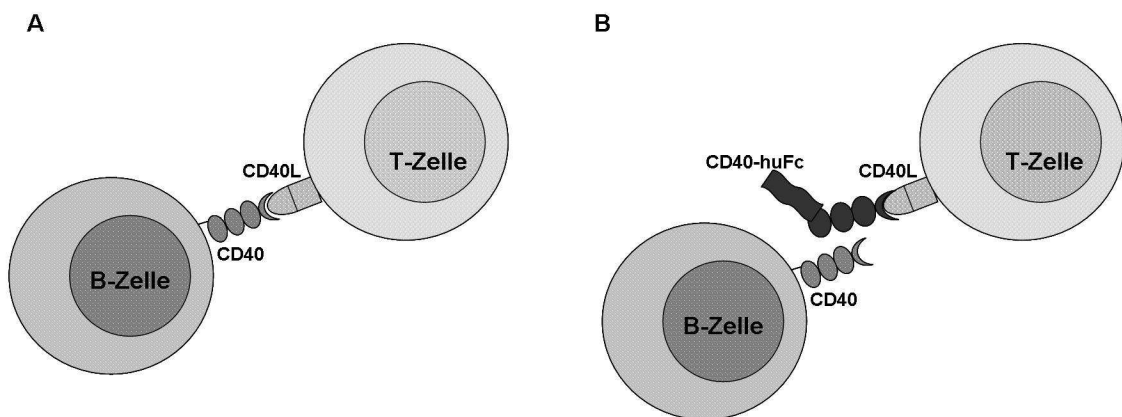


Abbildung 41: Schema der Inhibition des CD40/CD40L-Systems

Das chCD40-Molekül ist unter anderem auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert. Sein Ligand (chCD40L, auch CD154 genannt) wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert (A). In der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion beider Moleküle durch ein RCAS(BP)A-basiertes lösliches chCD40-huFc Molekül verhindert werden (B).

5.2.1 Klonierung verschiedener chCD40 Konstrukte

Als Basis der Klonierungsarbeiten diente ein Konstrukt, welches die Sequenzen für das Signalpeptid sowie den extrazellulären und einem Teil des transmembranen Anteils von chCD40 im Expressionsvektor pCIneo enthält. Es wird im Folgenden als lösliches chCD40 bezeichnet. Um das chCD40-Protein detektieren zu können, sollte über eine Umklonierung der Fc-Teil des humanen Immunglobulins angefügt werden.

5.2.1.1 Klonierung von chCD40 in pCR3

Für die Erstellung des chCD40-huFc Konstruktes wurde die Sequenz für lösliches chCD40 aus dem Vektor pCIneo mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurden Primer verwendet, welche die zur Umklonierung benötigten Schnittstellen anfügten (siehe 4.3.1). Das Fragment wurde in einen Vektor ligiert, welcher die Sequenz für humanes Fc enthält (pCR3-huFc) (siehe Abbildung 42). Der Erfolg dieser Ligation wurde in einem diagnostischen Restriktionsenzymverdau überprüft. Die Länge der erhaltenen DNA-Fragmente wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (siehe Abbildung 43). Die erhaltenen Banden zeigten Fragmente einer Größe von 3121, 2189, 609 und 341 bp, was auf eine erfolgreiche Ligation des löslichen chCD40 in Vektor pCR3-huFc schließen ließ.

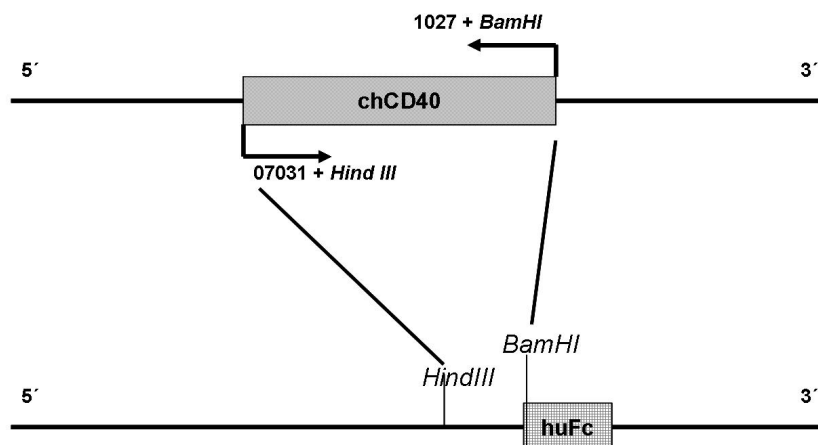


Abbildung 42: Klonierung von chCD40 in pCR3-huFc

Die Sequenz für lösliches chCD40 wurde per PCR auf dem Ausgangsplasmid amplifiziert. Hierbei wurden Primer verwendet, welche die für die Klonierung benötigten Schnittstellen *BamHI* und *HindIII* anfügten. Nach Restriktionsenzymverdau wurde das Fragment in, mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor ligiert, welcher am 3' Ende der Insertionsstelle die Sequenz für humanes Fc enthält.

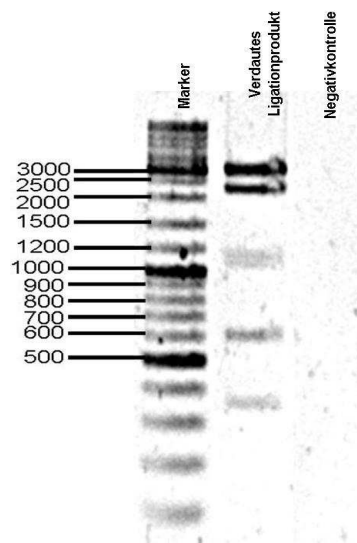


Abbildung 43: Diagnostischer Verdau bei Klonierung von chCD40 in pCR3-huFc
Um den Erfolg der Ligationsreaktion zu überprüfen, wurden 300 ng des Plasmids mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *PvuII* verdaut. 5 µl des Reaktionsprodukts wurden auf ein Agarosegel aufgetragen.

5.2.1.2 Klonierung von chCD40-huFc in RCAS(BP)A

Das in 5.2.1.1 erstellte Konstrukt diente nunmehr als Basis für eine Klonierung von chCD40-huFc in RCAS(BP)A. Die Sequenz für chCD40-huFc wurde hierfür per PCR mit Primern amplifiziert, welche am sowohl 5' als auch am 3' Ende des Inserts *ClaI* Schnittstellen anfügten. Nach *ClaI*-Verdau wurde das Fragment mit ebenfalls *ClaI* verdautem und dephosphoryliertem RCAS(BP)A ligiert (siehe 4.3.7 und Abbildung 44).

Das Plasmid wurde in den *E. coli* Stamm JM 109 transformiert. Hiervon wurden nach zwölfstündiger Inkubation auf Agarplatten Einzelkolonien auf Integration des Plasmids per PCR getestet (siehe 4.3.8 und 4.3.9). Aus mehreren positiv getesteten Bakterienklonen wurde Plasmid präpariert, in welchen die Orientierung des ligierten Inserts überprüft wurde. Dafür wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *StuI* durchgeführt (siehe 4.3.5). Schließlich wurde ein Klon ausgewählt, welcher das Plasmid mit Insert in richtiger Orientierung enthielt. Die korrekte Sequenz von chCD40-huFc wurde durch Sequenzierung (Firma GATC, Konstanz) bestätigt. Hiervon wurde ein Bakterienstock angelegt und Plasmid für die weiteren Arbeiten präpariert.

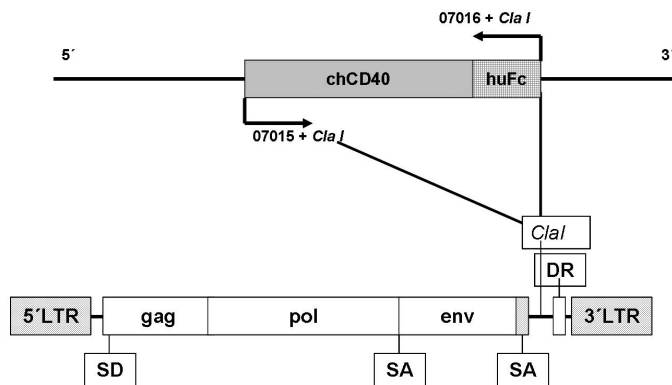


Abbildung 44: Klonierung von chCD40-huFc in RCAS(BP)A

Die in pCR3 enthaltene Sequenz für chCD40-huFc wurde per PCR amplifiziert. Es wurden hierfür Primer entworfen, welche die für die Klonierung in RCAS(BP)A benötigten *ClaI* Schnittstellen anfügten. Das Amplifikat sowie RCAS(BP)A wurden *ClaI* verdaut, der Vektor zusätzlich dephosphoryliert. Es folgte eine Ligationsreaktion in den Verhältnissen von 1:5 und 1:8.

5.2.2 *In vitro*-Untersuchungen zur Funktionalität von chCD40-huFc

Um Hinweise auf eine biologische Aktivität des chCD40-huFc Proteins zu erhalten, wurden zeitgleich zur RCAS(BP)A-Klonierung bereits *in vitro*-Versuche mit dem zuvor hergestellten Konstrukt von chCD40-huFc im Expressionsvektor pCR3 durchgeführt. Hierfür wurde die Zelllinie 293-T mit dem Konstrukt transfiziert (siehe 4.4.1) und Zellkulturüberstand für die weiteren Versuche gewonnen. Nach Fertigstellung des RCAS(BP)A-chCD40-huFc-Konstruktes wurden damit Linie „0“ Hühnerembryofibroblasten (HEF) transfiziert (siehe 4.4.2). Auch hier wurde Überstand gewonnen, welcher für *in vitro*-Tests eingesetzt wurde.

5.2.2.1 Nachweis von chCD40-huFc in Zellkulturüberstand

Zum Nachweis von chCD40-huFc im Überstand der transfizierten Zellen wurden die in 4.7.2.1 und 4.7.2.2 beschriebenen ELISA-Tests entwickelt. Einerseits wurde ein Sandwich-ELISA zur Detektion des humanen Fc-Tags durchgeführt. Im zweiten Test wurde der Antikörper AV79 zur Beschichtung eingesetzt, welcher an den extrazellulären Teil des chCD40-Moleküls bindet. In beiden Tests konnte ein deutlicher Gehalt von chCD40-huFc im Überstand festgestellt werden (siehe Abbildung 45). Zudem konnte bestätigt werden, dass das chCD40-huFc

Protein vom Antikörper AV79 gebunden wird (Abbildung 45B und D). Die unterschiedlichen Mengen an chCD40-huFc sind auf die unterschiedlichen Zeiten zwischen Transfektion oder Teilung der Zellen und der Gewinnung des Überstandes zurückzuführen.

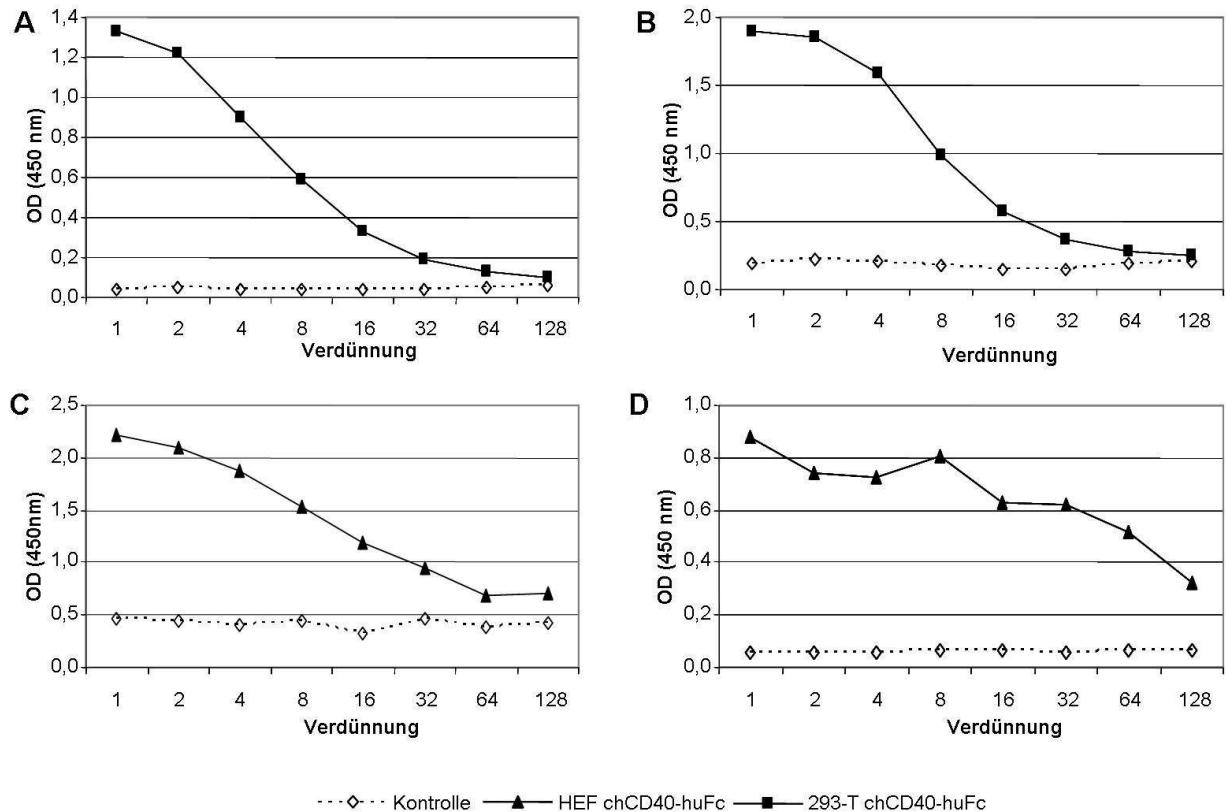


Abbildung 45: Nachweis von chCD40-huFc in Zellkulturüberständen

Nunc®Maxisorp Platten wurden mit anti-human-Fc (A+C) oder dem gegen chCD40 gerichteten Antikörper AV79 (B+D) beschichtet. Darauf wurden der zu testende Zellkulturüberstand und der sekundäre anti-human-Fc-POD-Antikörper gegeben. Abbildungen A und B zeigen den Nachweis von chCD40-huFc in 293-T Zellkulturüberstand. In den Abbildungen C und D wurde Überstand RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierter Zellen getestet. Als Kontrolle diente eGFP haltiger Zellkulturüberstand.

5.2.2.2 Nachweis der Bindung von chCD40-huFc an chCD40L-Fusionsprotein

Zur Vermittlung einer biologischen Wirkung muss das chCD40-huFc Protein an den chCD40-Liganden binden. Um dies in *in vitro*-Untersuchungen zu prüfen, wurde ein Maus-CD8-chCD40L-Fusionsprotein benutzt, welches bereits für Arbeiten an diesem System getestet und eingesetzt wurde [174, 175].

Nachweis der Bindung im ELISA

Mittels ELISA wurde getestet, ob eine Bindung des chCD40-huFc-Moleküls an das chCD40L-Fusionsprotein stattfindet (Aufbau siehe 4.7.2.3 und Abbildung 9C). Wie in Abbildung 46 dargestellt, konnte eine Bindung zwischen beiden Molekülen im ELISA gezeigt werden.

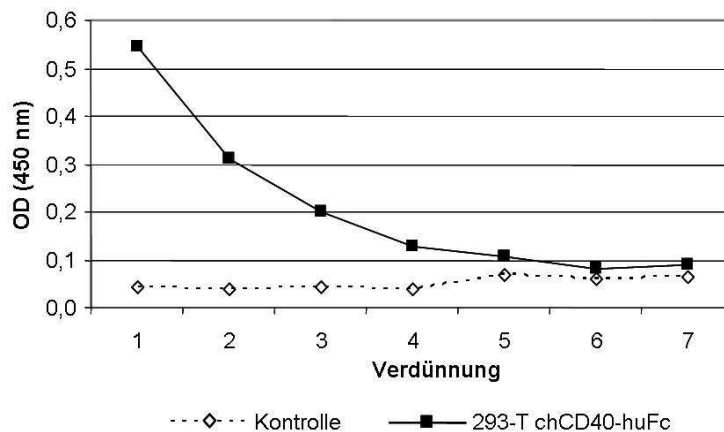


Abbildung 46: Bindung von chCD40-huFc an chCD40L im ELISA
chCD40L-Fusionsprotein wurde mit Hilfe eines plattengebundenen anti-Maus-CD8-Antikörpers (YTS 169) immobilisiert. Als Probe wurde chCD40-huFc haltiger 293-T Zellkulturüberstand aufgetragen. Ein sekundärer anti-human-Fc-Antikörper diente zur Detektion von chCD40-huFc. Als Negativkontrolle wurde eGFP-haltiger Zellkulturüberstand eingesetzt.

Inhibition der Bindung von chCD40L-Fusionsprotein an chCD40 auf HD11-Zellen

Um die Bindung zwischen dem chCD40-huFc Molekül und chCD40L besser nachweisen zu können, wurde eine Antikörperfärbung von chCD40 auf der Oberfläche von HD11 Zellen mit nachfolgender durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt. Diese Hühnermakrophagen-Zelllinie exprimiert chCD40-Moleküle in hoher Anzahl auf der Zelloberfläche.

Nach Etablierung der in Abbildung 47 dargestellten Färbung wurde versucht, die Bindung von chCD40L an membranständiges chCD40 der HD11-Zellen durch Präinkubation mit chCD40-huFc haltigem Zellkulturüberstand zu inhibieren (siehe 4.8.2.3). Im Overlay mit der Färbung ohne Präinkubation des chCD40L-Fusionsproteins (siehe Abbildung 48) ist eine deutlich sichtbare Linksverschiebung der Kurve erkennbar. Dies lässt eine konzentrationsabhängige Inhibition der Bindung von chCD40L an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche erkennen.

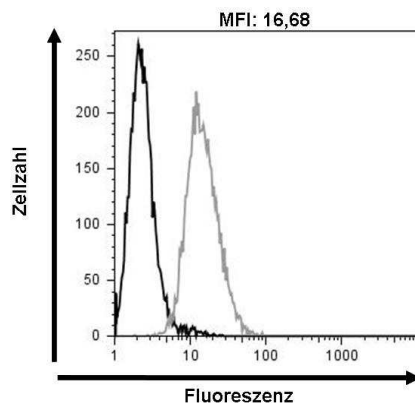


Abbildung 47: Färbung von chCD40 auf der Oberfläche von HD11-Zellen

HD11-Zellen wurden nacheinander mit chCD40L-Fusionsprotein, anti-Maus-CD8- und anti-Ratte-IgG-Antikörper inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert (graue Linie). Als Negativkontrolle wurde statt chCD40L-Fusionsprotein PBS eingesetzt (schwarze Linie). Oberhalb ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

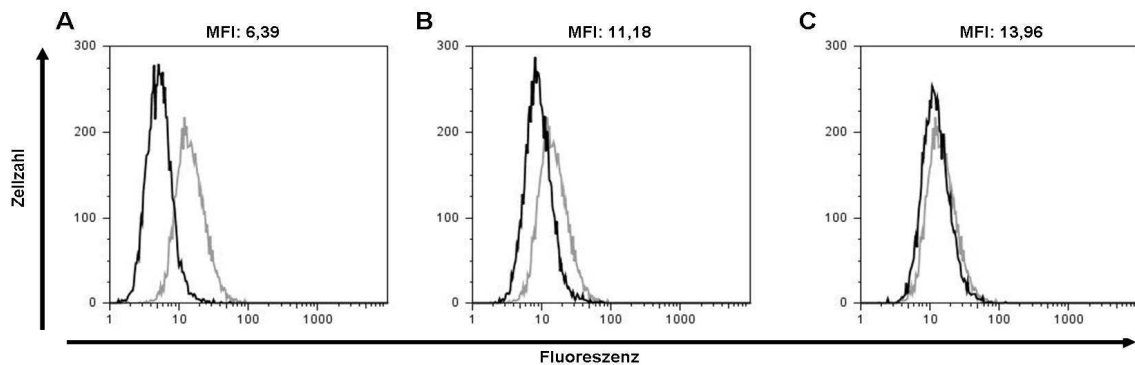


Abbildung 48: Inhibition der Bindung von chCD40L-Fusionsprotein an membranständiges chCD40 von HD11-Zellen

chCD40L-Fusionsprotein wurde in z. T. verdünntem Überstand chCD40-huFc-transduzierter HEF der Linie „0“ präinkubiert. Der Überstand wurde unverdünnt (A), sowie 1:2 (B) und 1:4 (C) verdünnt eingesetzt (schwarze Linie). In der Positivkontrolle wurde chCD40L-Fusionsprotein ohne Präinkubation eingesetzt (graue Linie). Oberhalb der Kurven ist jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

Inhibition der chCD40L induzierten B-Zell-Proliferation im ^3H -Thymidin-Assay

Das bereits in den vorangegangenen Versuchen verwendete chCD40L-Fusionsprotein bewirkt eine Proliferation von B-Zellen in Kultur [174]. Im folgenden Experiment wurde versucht, diese Proliferation durch Präinkubation des chCD40L-Fusionsproteins mit chCD40-huFc haltigem Zellkulturüberstand zu hemmen (siehe 4.2.2.6). Analog zu der oben beschriebenen Antikörperfärbung, sollte chCD40-huFc auch hier chCD40L-Fusionsprotein binden und somit dessen Bindung an membranständigen chCD40 Rezeptor verhindern.

Hierfür wurden aus der Milz eines Huhns der Linie M11 Leukozyten präpariert (siehe 4.2.1.3) und ausplattiert. Dazu wurde nun entweder chCD40L-Fusionsprotein oder mit chCD40-huFc haltigem 293-T Überstand präinkubiertes chCD40L-Fusionsprotein in einer log2 Titration gegeben. Nach 48 Stunden wurde radioaktives $^3\text{[H]}$ -Thymidin zu den Zellen pipettiert und diese für weitere 16 Stunden inkubiert.

Wie Abbildung 49 zeigt, konnte die proliferative Wirkung des chCD40L-Fusionsproteins durch Präinkubation mit chCD40-huFc-haltigen Zellkulturüberstand gehemmt werden. Im Vergleich zur Positivkontrolle, bei welcher das Protein in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zu ca. 350.000 Counts führte, war die Reaktion bei präinkubiertem Zytokin in dieser Konzentration mit ca. 100.000 Counts deutlich geringer (siehe Abbildung 49). Dies zeigt, dass chCD40-huFc an chCD40L bindet und so die Aktivierung von B-Zellen durch Bindung an membranständiges chCD40 verhindert.

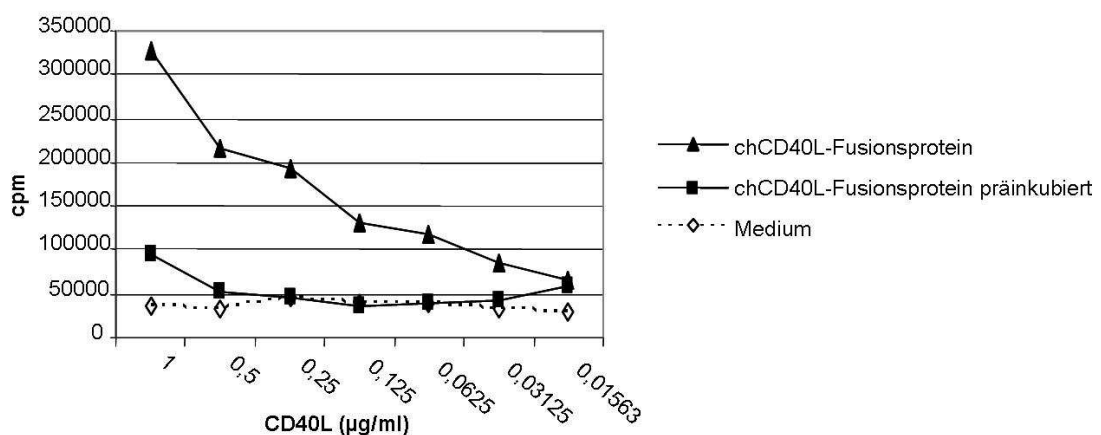


Abbildung 49: Inhibition der chCD40L vermittelten Proliferation von B-Zellen

Die Milzleukozyten eines Huhns der Linie M11 wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation präpariert und auf eine 96-Loch-Zellkulturplatte überführt. Sie wurden mit einer Titrationsreihe von chCD40L-Fusionsprotein oder mit chCD40-huFc haltigem präinkubiertem Fusionsprotein kultiviert. Als Negativkontrolle diente Medium. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit radioaktivem $^3\text{[H]}$ -Thymidin für weitere 16 Stunden inkubiert. Auf der y-Achse sind die im Szintillationsmesser gemessenen Ereignisse pro Minute (cpm) dargestellt.

5.2.3 *In vivo*-Untersuchungen an RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Hühnern

Nachdem die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente ergaben, dass das lösliche chCD40-huFc Protein als Decoy-Faktor für chCD40L einsetzbar ist, sollten nun Hühner mit dem erstellten Konstrukt transduziert werden. Hierfür sollten Tiere der Linie LSL verwendet werden, da sich der Import von Linie „0“ Eiern in der Vergangenheit als kompliziert erwiesen hatte und diese Hühnerlinie zudem relativ schlechte Schlupfraten erzielt. Zudem konnten in den Versuchen zur Charakterisierung des RCAS-Systems mit Tieren der Linie LSL ausreichende Expressionsraten erzielt werden.

Für *in vivo*-Versuche wurden in Eier der Hühnerlinie LSL am dritten Tag der Bebrütung HEF der Linie „0“ injiziert, welche zuvor mit dem RCAS(BP)A-chCD40-huFc oder RCAS(BP)A-Vektor ohne Insert transduziert worden waren.

In einem Langzeitversuch wurde den Tieren nach dem Schlupf in regelmäßigen Abständen Blut für Untersuchungen des Plasmas und durchflusszytometrische Analysen entnommen. Im Alter von 24 Tagen wurden die Küken mit 50 µg DNP-KLH intraperitoneal (ohne Adjuvans) immunisiert. Es folgte ein Boost am Tag 45 in gleicher Weise. Die Tierzahlen der RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten und der RCAS(BP)A-transduzierten Kontrollgruppe waren sieben bzw. sechs Tiere. Da Tiere im Verlauf des Versuch verstarben, umfasste die Kontrollgruppe an den Versuchstagen 46 bis 73 vier Tiere. Am Tag 73 waren in der RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Gruppe nur noch sechs Tiere. Die Tiere verstarben auf Grund von Technopathien, welche nicht mit dem Tierversuch an sich im Zusammenhang stehen. Die Tiere wurden am 74. Lebenstag nach Betäubung durch Blutentzug getötet. Es wurden Milzen, Thymi und Knochenmark zur Präparation von Leukozyten sowie Bursae fabricii für die Histologie entnommen.

5.2.3.1 *In vivo*-Expression von chCD40-huFc

Zunächst wurde versucht, das lösliche chCD40-huFc Protein im Plasma der transduzierten Hühner nachzuweisen. Hierfür wurden Plasmaproben in einem huFc-Sandwich-ELISA getestet (Aufbau siehe 4.7.2.1).

Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnte bei allen RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Tieren ein deutlicher Plasmaspiegel des Proteins nachgewiesen werden. In Abbildung 50 sind Analysen der Tage 10, 31 und 73 dargestellt. Wie bereits in den Versuchen mit RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten Hühnern der Linie LSL beobachtet, divergierten auch hier die Spiegel des RCAS(BP)A-basierten Proteins zwischen den einzelnen Tieren. Die Spiegel an RCAS(BP)A-basiertem chCD40-huFc wurden auf den mitgeführten Kontrollüberstand normalisiert.

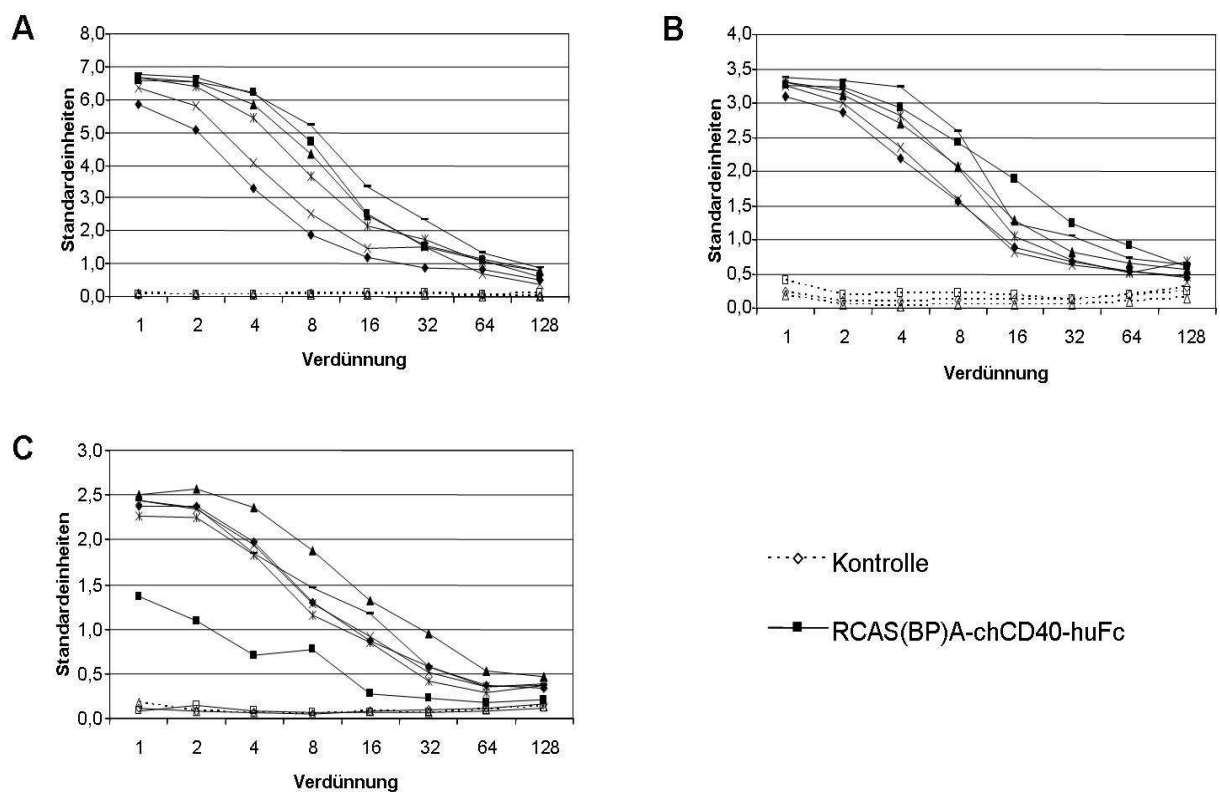


Abbildung 50: Expression des chCD40-huFc Proteins *in vivo*

Plasma RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierter Tiere wurde als Probe in einem Sandwich-ELISAs gegen das humane Fc-Tag aufgetragen. Jede Titrationkurve entspricht der Plasmaprobe eines Einzeltieres an den Versuchstagen 10 (A), 31 (B) und 73 (C). Es erfolgte eine Standardisierung der Titer auf den mitgeführten Kontrollüberstand.

5.2.3.2 *In vivo*-Wirkung von RCAS(BP)A-basierter chCD40-huFc-Expression auf Blutleukozyten

Zur Untersuchung der Wirkung von chCD40-huFc wurden Tiere mit RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-Vektor ohne Insert transduziert. Im erwähnten Langzeitversuch erfolgten regelmäßige Blutentnahmen zur Gewinnung von Leukozyten und Plasma.

Durchflusszytometrische Analyse der PBL

Aus dem entnommenen Blut wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Paque-Lösung Leukozyten präpariert, welche nach einer Färbung mit verschiedenen Leukozytenmarkern im Durchflusszytometer analysiert wurden.

Für diese Analysen wurden Doppelfärbungen (siehe 4.8.2.1) sowie die in 4.8.2.2 beschriebene Dreifachfärbung angewendet. Für letztere wurde ein mit Spektralrot konjugierter anti-CD45-Antikörper (LT40-SPRD) als Leukozytenmarker eingesetzt. Zusätzlich erfolgten indirekte Färbungen mit FITC- und PE-konjugierten Sekundärantikörpern. Die über LT40-SPRD als Leukozyten markierten Zellen konnten in den anderen beiden Fluoreszenzen weiter analysiert werden. Die Gating-Strategie der Doppelfärbung wurde bereits in Abbildung 27 dargestellt, das Gating der Dreifachfärbung ist in Abbildung 51 gezeigt.

Wie Abbildung 52 verdeutlicht, zeigten die RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Tiere, verglichen mit den RCAS(BP)A-transduzierten Kontrollen, zu allen untersuchten Zeitpunkten verminderte Frequenzen von AV20-positiven B-Zellen. Außer an den Tagen 10 und 24 war diese Reduktion signifikant. Auch bei der Färbung gegen die leichte Kette (L-Kette) des Immunglobulinmoleküls (B-Zellen) konnte eine deutliche Reduktion der L-Kette-positiven Zellen festgestellt werden, diese war jedoch nur an den Tagen 46 und 59 signifikant.

Die durchschnittlichen Frequenzen von T-Zellen (CD3, TCR-1, -2 und -3) und Thrombozyten (K1) beider Gruppen zeigten zu keinem der analysierten Zeitpunkte signifikante Unterschiede. Monozyten bzw. Makrophagen (Kul01) waren am 59. Lebenstag der Versuchstiere in der Gruppe der RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Gruppe signifikant vermindert.

Für B-Zellen (AV20-positiv) wurde die mittlere Fluoreszenzintensität des an chCD40 bindenden Antikörpers AV79 bestimmt (siehe Abbildung 53). An den Tagen 10, 24 und 59 war diese in der RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. An den Tagen 10 und 59 war diese Erhöhung signifikant.

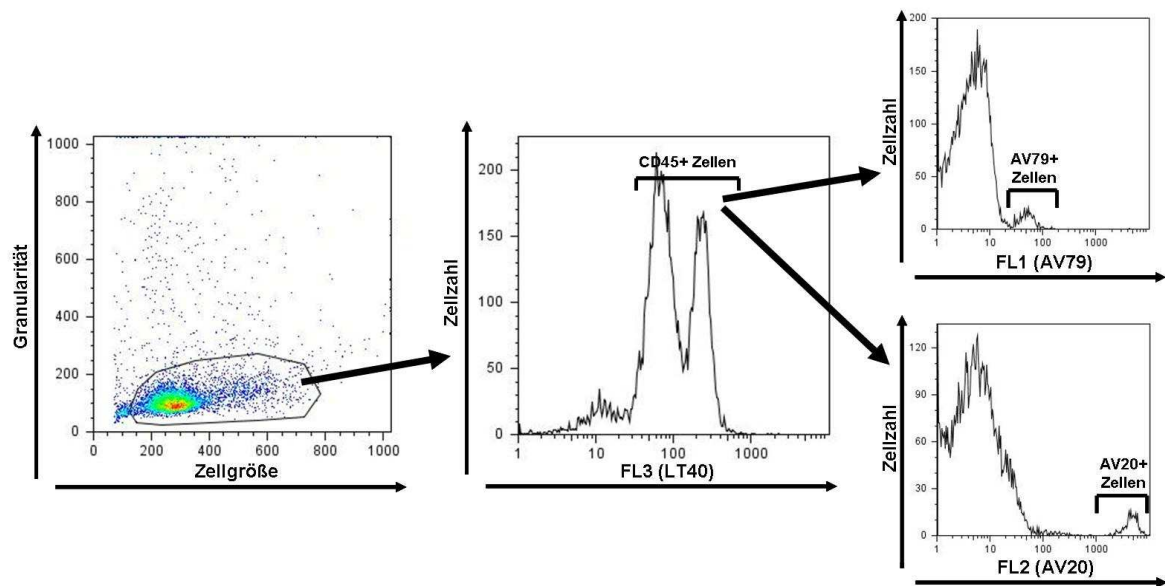


Abbildung 51: Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie in der Dreifachfärbung von Blutleukozyten

Zunächst wurde die Lymphozytenpopulation an Hand der Größe und der Granularität der Zellen im DotPlot separiert. Dann wurden die CD45-positiven Leukozyten im Histogramm der dritten Fluoreszenz gegatet. Aus dieser Population wurden schließlich in der ersten bzw. zweiten Fluoreszenz die Populationen an AV79-positiven (chCD40 exprimierende Zellen) und AV20-positiven B-Zellen bestimmt.

	Gruppe	AV20	L-Kette	CD3	TCR-1 TCR-2 TCR-3	K1	Kul01
Tag 10	chCD40-huFc	1,28 ± 0,67	1,56 ± 0,69	18,52 ± 5,70	17,87 ± 5,32	52,12 ± 13,44	3,52 ± 1,02
	Kontrolle	2,23 ± 1,40	2,82 ± 1,77	19,03 ± 6,30	18,54 ± 6,89	63,27 ± 8,63	3,22 ± 1,55
Tag 24	chCD40-huFc	3,97 ± 1,64	5,80 ± 2,53	39,34 ± 11,19	39,37 ± 11,98	31,97 ± 14,11	2,97 ± 1,21
	Kontrolle	4,40 ± 1,42	6,48 ± 2,19	33,14 ± 12,47	34,76 ± 12,63	42,24 ± 17,34	2,13 ± 1,52
Tag 46	chCD40-huFc	3,50 ± 0,86**	4,49 ± 1,09**	23,06 ± 3,86	23,73 ± 4,15	57,72 ± 9,02	1,58 ± 0,48
	Kontrolle	6,87 ± 1,39	7,91 ± 0,49	26,29 ± 4,69	27,35 ± 4,98	54,98 ± 3,93	1,12 ± 0,42
Tag 59	chCD40-huFc	2,91 ± 1,27**	4,50 ± 1,51**	23,25 ± 7,85	23,54 ± 7,70	63,54 ± 7,75	1,24 ± 0,27*
	Kontrolle	5,64 ± 1,03	7,81 ± 0,59	24,83 ± 2,96	28,24 ± 2,35	57,15 ± 1,66	1,95 ± 0,30
Tag 73	chCD40-huFc	3,99 ± 1,40*	6,74 ± 2,68	28,17 ± 7,77	31,45 ± 7,54	53,08 ± 14,48	2,01 ± 1,61
	Kontrolle	6,58 ± 0,99	10,00 ± 3,98	30,50 ± 7,06	33,31 ± 7,69	50,43 ± 12,63	1,89 ± 0,56

Tabelle 15: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten Expression von chCD40hu-Fc auf Lymphozytenfrequenzen im Blut

Es erfolgte ein Vergleich zwischen RCAS(BP)A-chCD40-huFc und als Kontrolle dienenden RCAS(BP)A-transduzierten Tieren. An den angegebenen Tagen wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnene PBL einer indirekten Doppelfärbung bzw. Dreifachfärbung unterzogen. Antikörper gegen CD45 (16-6 und LT40) wurden hierbei als Panleukozytenmarker eingesetzt. Angegeben sind die Anteile der für die jeweiligen Antikörper-positiven Zellen an CD45-positiven Leukozyten.

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung.

Mit * gekennzeichnete Werte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf (für * $p < 0,05$, für ** $p < 0,01$).

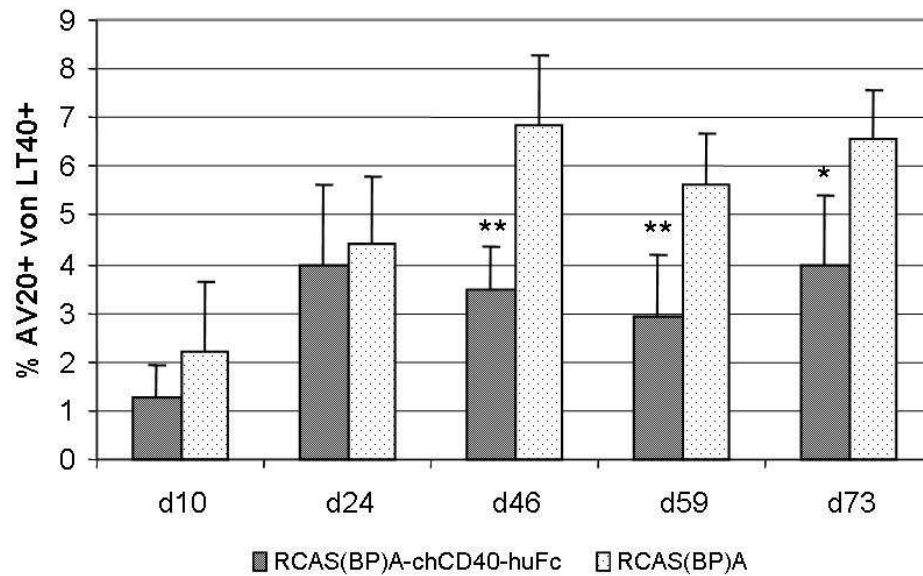


Abbildung 52: Verlauf der Frequenzen AV20-positiver B-Zellen von RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierten Tieren

Dargestellt sind Mittelwerte der auf CD45 bezogenen Frequenzen AV20-positiver B-Zellen der beiden Versuchsgruppen im Verlauf des *in vivo*-Versuches.

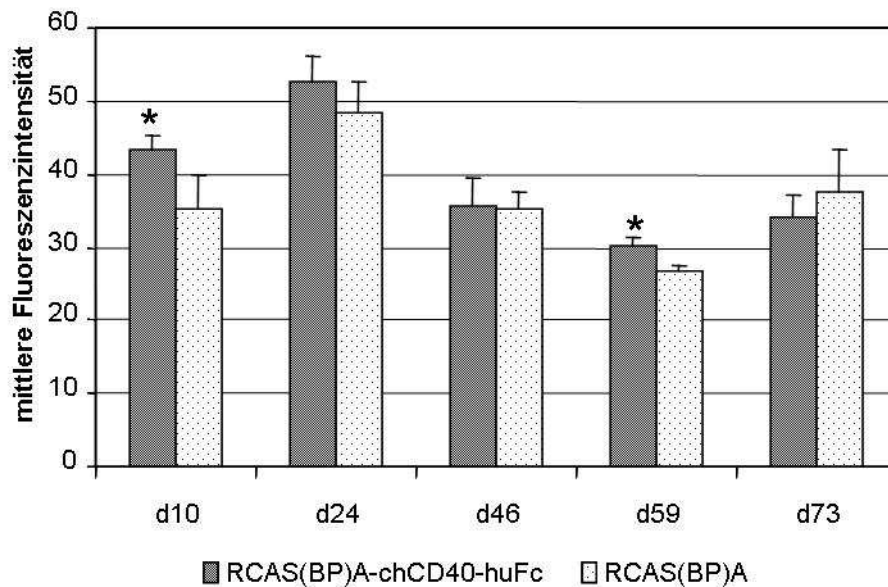


Abbildung 53: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von AV79 auf B-Zellen RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierter Tiere

Dargestellt sind Mittelwerte der MFI von AV79 auf B-Zellen der beiden Versuchsgruppen

Analyse von absoluten Zellzahlen in Vollblut

Zum Ende des erwähnten Langzeitversuches wurde ein Blutbild mit der von Seliger et al. entwickelten und etablierten Methode erstellt [274]. Dabei wurden die absoluten Zellzahlen einzelner Leukozytenpopulationen in Vollblut bestimmt.

Hierbei ergab sich, dass die RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierte Gruppe, neben einem relativ erniedrigten Anteil an AV20-positiven B-Zellen (siehe Tabelle 15), auch eine signifikant erniedrigte absolute B-Zellzahl aufwies. Für T-Zellen (CD3), Thrombozyten (K1) und myeloide Zellen (Kul01) konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden.

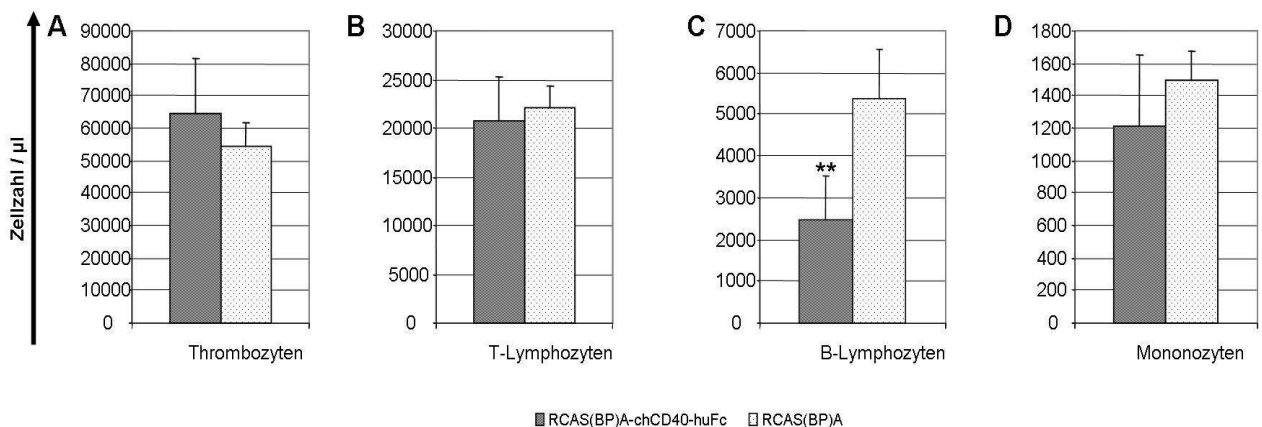


Abbildung 54: Absolute Quantifizierung von Leukozytenpopulationen RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierter Tiere am Tag 73

Aus dem Vollblut von sechs RCAS(BP)A-chCD40-huFc sowie vier RCAS(BP)A-transduzierten Tieren wurden mit Hilfe einer direkten Antikörperfärbung in Beads enthaltenden TruCount®Tubes die absoluten Zellzahlen pro µl Blut bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen \pm Standardabweichung.

Mit ** gekennzeichnete Werte weisen einen signifikanten Unterschied auf ($p < 0,01$).

5.2.3.3 Auswirkungen auf das Organgewicht am Tag 74

Der in 5.2.3 beschriebene Langzeitversuch endete am 74. Lebenstag. Nach Betäubung und anschließender Tötung durch Blutentzug wurden verschiedene Organe entnommen. Sofort nach der Entnahme wurde das Gewicht der einzelnen Milzen und Bursae fabricii auf einer Analysenwaage bestimmt. Da in diesem Alter männliche Tiere schon deutlich mehr Gewicht haben als weibliche Tiere sowie um Effekte einer unterschiedlich starken Ausblutung zu vermeiden, wurde

das Organgewicht ins Verhältnis zum Körpergewicht des jeweiligen Tieres gesetzt. Die Verhältnisse von Milz- zu Körpergewicht waren in den beiden Gruppen unverändert. Jedoch war zu beobachten, dass RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierte Tiere ein signifikant vermindertes Verhältnis von Bursa- zu Körpergewicht hatten (siehe Abbildung 55).

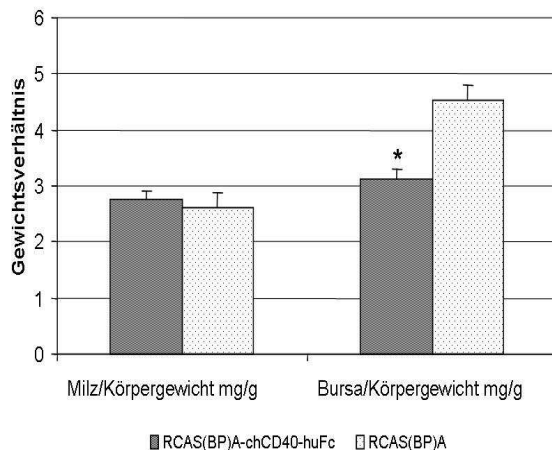


Abbildung 55: Auswirkungen von RCAS(BP)A-chCD40-huFc auf Organgewichte

Milz und Bursa von sechs RCAS(BP)A-chCD40-huFc und vier RCAS(BP)A-transduzierten Tieren wurden am Tag 74 entnommen und auf einer Analysenwaage gewogen. Das Organgewicht wurde ins Verhältnis zum Körpergewicht des jeweiligen Tieres gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte der beiden Gruppen \pm Standardabweichung.

Der mit * gekennzeichnete Wert weist einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf ($p < 0,05$).

5.2.3.4 Auswirkungen auf Leukozytenfrequenzen in lymphatischen Organen am Tag 74

Zum Versuchsende am 74. Lebenstag der Tiere, wurden Milz und Thymus entnommen. Ein Teil hiervon wurde für die Präparation von Leukozyten verwendet (siehe 4.2.1.3). Zur Gewinnung von Knochenmark wurden Femura entnommen und Zellen mit PBS ausgespült.

Milz

Nach Präparation mittels Ficoll-Paque-Lösung (siehe 4.2.1.3) wurden die Milzleukozyten einer Doppel- bzw. Dreifachfärbung unterzogen, wie für Blutleukozyten in 4.8.2.1 und 4.8.2.2 beschrieben. Zur Differenzierung der Leukozytenpopulation wurden wiederum Antikörper gegen CD45 eingesetzt. Zusätzlich wurden die Zellen mit den in Abbildung 56 aufgeführten Antikörpern gefärbt. Bei keiner der Färbungen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

Der relative Anteil an AV20- sowie L-Kette-positiven B-Zellen, CD3- und TCR-1-, TCR-2- und TCR-3-positiven T-Zellen, K1-positiven Thrombozyten und Kul01-positiven myeloiden Zellen war zwischen der RCAS(BP)A-chCD40-huFc und der RCAS(BP)A-transduzierten Gruppe nicht signifikant verändert.

Knochenmark

Knochenmarkszellen wurden in gleicher Weise wie Milzleukozyten gefärbt. Auch im Knochenmark beider untersuchten Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede der Anteile von B-Zellen (AV20, L-Kette), T-Zellen (CD3, TCR-1, TCR-2 und TCR-3), Thrombozyten (K1) und myeloiden Zellen (Kul01) an CD45-positiven Leukozyten festgestellt werden.

Thymus

Leukozyten aus dem Thymus wurden in einer Färbung mit Antikörpern gegen die T-Zell-Antigene CD4 und CD8 näher analysiert. In Abbildung 58 wird deutlich, dass die Zahl an CD4/CD8 doppelt positiven T-Zellen in den RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Hühnern signifikant vermindert war.

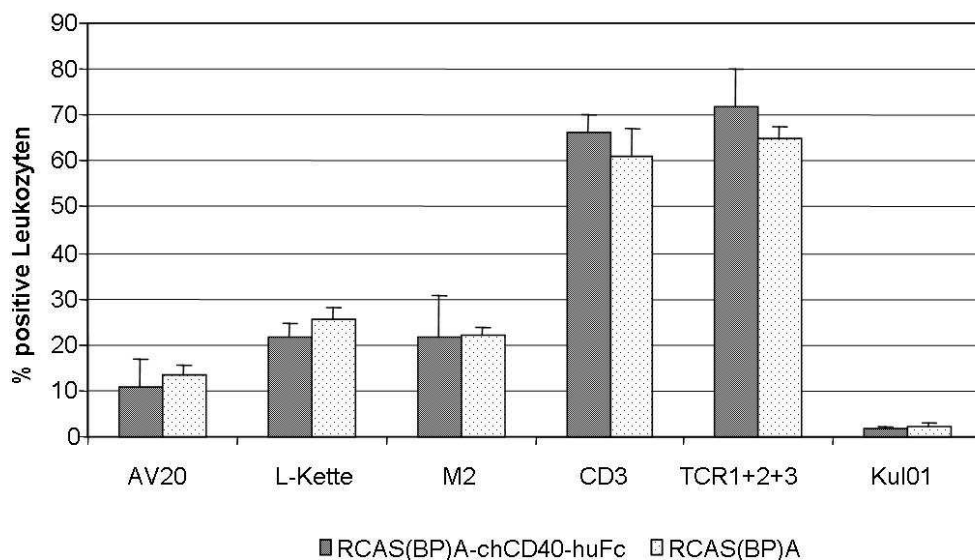


Abbildung 56: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten Expression von chCD40-huFc auf Milzleukozyten

Am Tag 74 wurden Leukozyten aus Milzen sechs RCAS(BP)A-chCD40-huFc und vier RCAS(BP)A-transduzierter Tiere mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen und mittels indirekter Doppel- bzw. Dreifachfärbung durchflusszytometrisch analysiert.

Es sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Frequenzen der für die jeweiligen Antikörper-positiven Zellen an CD45-positiven Leukozyten angegeben.

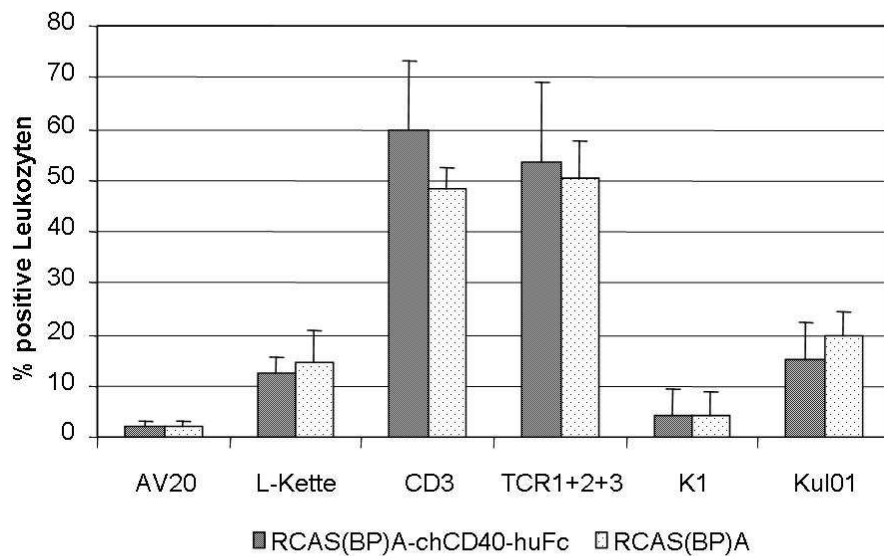


Abbildung 57: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chCD40-huFc-Expression auf Leukozytenfrequenzen im Knochenmark

Knochenmarkszellen von sechs RCAS(BP)A-chCD40-huFc und vier RCAS(BP)A-transduzierten Tieren wurden am 74. Lebenstag durch Ausspülen von Femura der einzelnen Tiere gewonnen und einer indirekten Doppel- bzw. Dreifachfärbung zur durchflusszytometrischen Analyse der Leukozytenfrequenzen unterzogen. Angegeben sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Frequenzen der für die jeweiligen Antikörper-positiven Zellen an CD45-positiven Leukozyten.

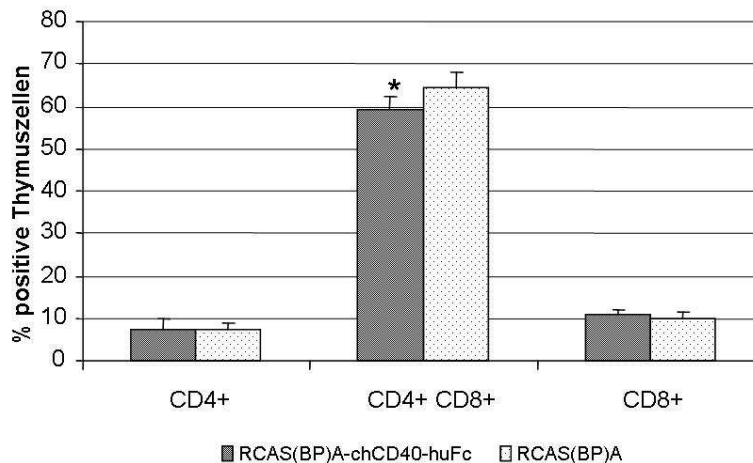


Abbildung 58: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten Expression von chCD40-huFc auf Thymuszellen

Thymuszellen von sechs RCAS(BP)A-chCD40-huFc und vier RCAS(BP)A-transduzierten Tieren am 74. Lebenstag wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen und nach einer indirekten Färbung mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der untersuchten Gruppen (\pm Standardabweichung).

Mit * gekennzeichnete Werte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf ($p < 0,05$).

5.2.3.5 Auswirkungen von RCAS(BP)A-basierter chCD40-huFc-Expression auf Plasmaimmunglobulinspiegel

Über den gesamten Zeitraum des in 5.2.3 beschriebenen Langzeitversuches wurden in regelmäßigen Abständen Plasmaproben der Tiere gewonnen. Die Gesamtspiegel von IgM, IgG und IgA im Plasma wurden mit dem in 4.7.2.5 beschriebenen ELISA getestet. Die RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierte Gruppe wies an den Tagen 46 und 73 signifikant erniedrigte IgM-Spiegel auf. Auch die IgA-Spiegel der RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Gruppe waren zeitweise niedriger als jene der Kontrollgruppe, hier war der Unterschied am Tag 31 signifikant. Ebenso wiesen diese Tiere niedrigere IgG-Spiegel im Plasma auf, jedoch war diese Differenz nicht signifikant. Die Immunglobulinmengen wurden auf das mitgeführte Standardserum normalisiert.

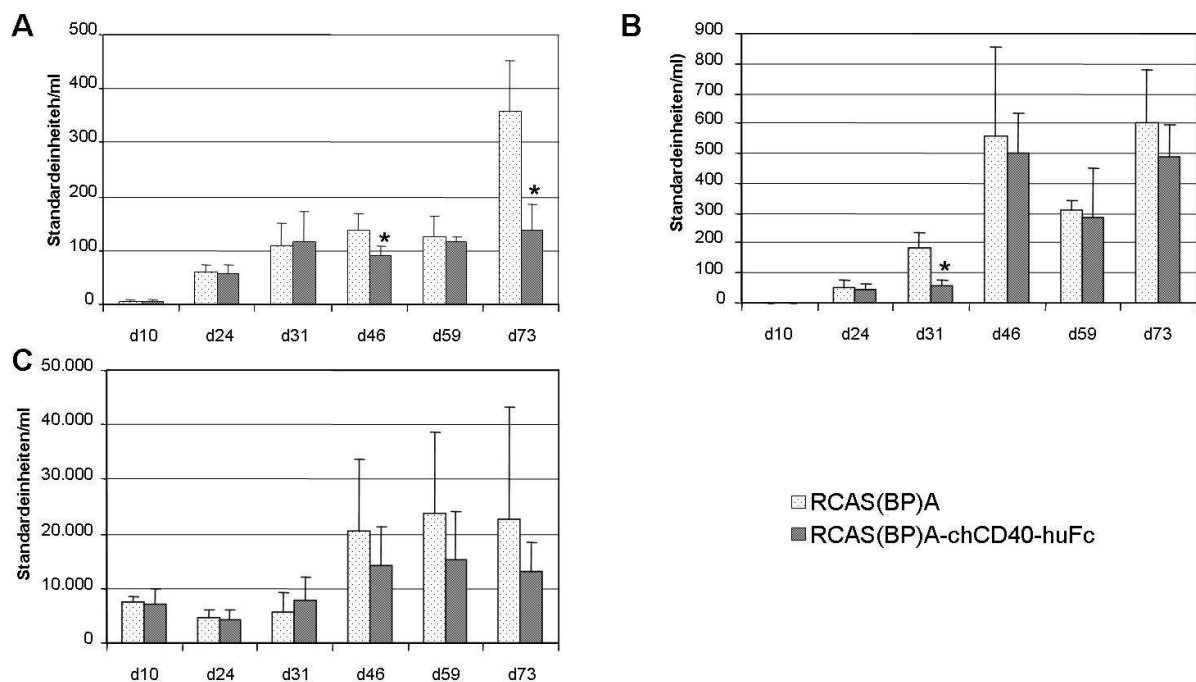


Abbildung 59: Auswirkungen der RCAS(BP)A-basierten chCD40-huFc-Expression auf die Gesamtimmunglobulinspiegel im Plasma
RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierten Tieren wurde an den angegebenen Zeitpunkten Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Dieses wurde als Probe im ELISA eingesetzt. Es wurde jeweils ein Sandwich-ELISA zur Bestimmung von IgM (A), IgA (B) und IgG (C) durchgeführt.

5.2.3.6 Immunhistologische Untersuchungen

Bursae fabricii wurden am Versuchsende zur Anfertigung von Gefrierschnitten für immunhistochemische Untersuchungen entnommen (siehe 4.9.2). Die Schnitte wurden nach dem in 4.9.5 angegebenen Protokoll mit den Antikörpern Bu1 (B-Zellen), M1 (IgM), G1 (IgG), K3 (IgA), Kul01 (myeloide Zellen) sowie BB3 (kortikomedulläre Grenzschicht) gefärbt (siehe Tabelle 11). In Abbildung 60 sind repräsentative Schnitte von RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierten Tieren gezeigt.

Der Antikörper Bu1 erkennt das B-Zell-Antigen chB6. Wie in dieser Färbung deutlich zu sehen ist (Abbildung 60A, B), sind die Zellen der Bursafollikel Bu1-positiv, können also als B-Zellen identifiziert werden. Bursazellen außerhalb der Follikel, wie beispielsweise Epithelzellen, waren Bu1 negativ. In einer anderen Färbung wurde der Antikörper BB3 eingesetzt, welcher das Kollagen der Membran zwischen Rinde und Mark der Bursafollikel anfärbt, um einen Aufschluss über die Struktur der Bursa fabricii zu erhalten (Abbildung 60C, D). Der Antikörper Kul01 erkennt ein nicht näher bekanntes Oberflächenantigen auf myeloiden Zellen (Abbildung 60E, F). Diese befanden sich in den interfollikulären Räumen. In Abbildung 61 sind Färbungen mit Antikörpern gegen Hühnerimmunglobulin gezeigt. IgM-positive Zellen fanden sich sowohl im Mark als auch in der Rinde der Bursafollikel. Im Mark waren die Zellen sehr stark IgM-positiv (Abbildung 61A, B). Dies könnte evtl. darauf zurück zu führen sein, dass hier nicht nur membranständiges IgM auf B-Zellen gebunden wird, sondern auch lösliches IgM, welches auf der Oberfläche von follikulär dendritischen Zellen immobilisiert ist. Ein kleiner Anteil der Zellen konnte im Mark mit einem Antikörper gegen IgG und auch gegen IgA angefärbt werden (Abbildung 61C, D und E, F). In den interfollikulären Bereichen der Bursa fabricii konnten positive Zellen aller drei Immunglobulinklassen gesehen werden. In keiner der durchgeführten Antikörperfärbungen konnte jedoch ein mikroskopisch erkennbarer Unterschied zwischen Tieren der RCAS(BP)A-chCD40-huFc und der RCAS(BP)A-transduzierten Gruppe festgestellt werden.

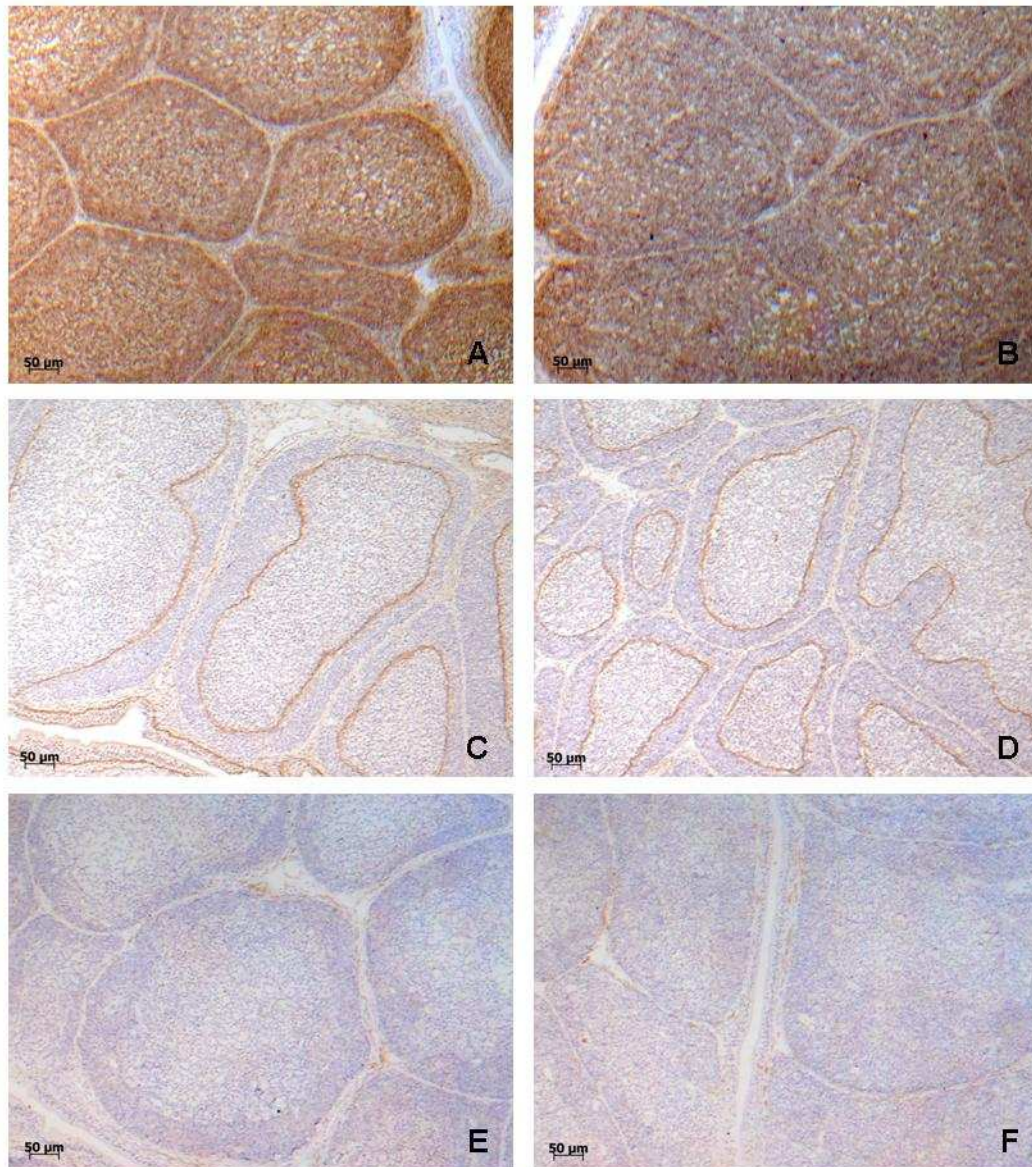


Abbildung 60: Immunhistochemische Färbung der Bursa fabricii RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierten Tieren am Tag 74 (Bildtafel 1)

Von Bursae fabricii RCAS(BP)A-chCD40-huFc (links) und RCAS(BP)A (rechts)-transduzierter Hühner wurden Gefrierschnitte angefertigt und mit den Antikörpern Bu1 (A, B), BB3 (C, D) und Kul01 (E, F) immunhistochemisch gefärbt. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun. Abgebildet sind jeweils repräsentative Schnitte beider Tiergruppen.

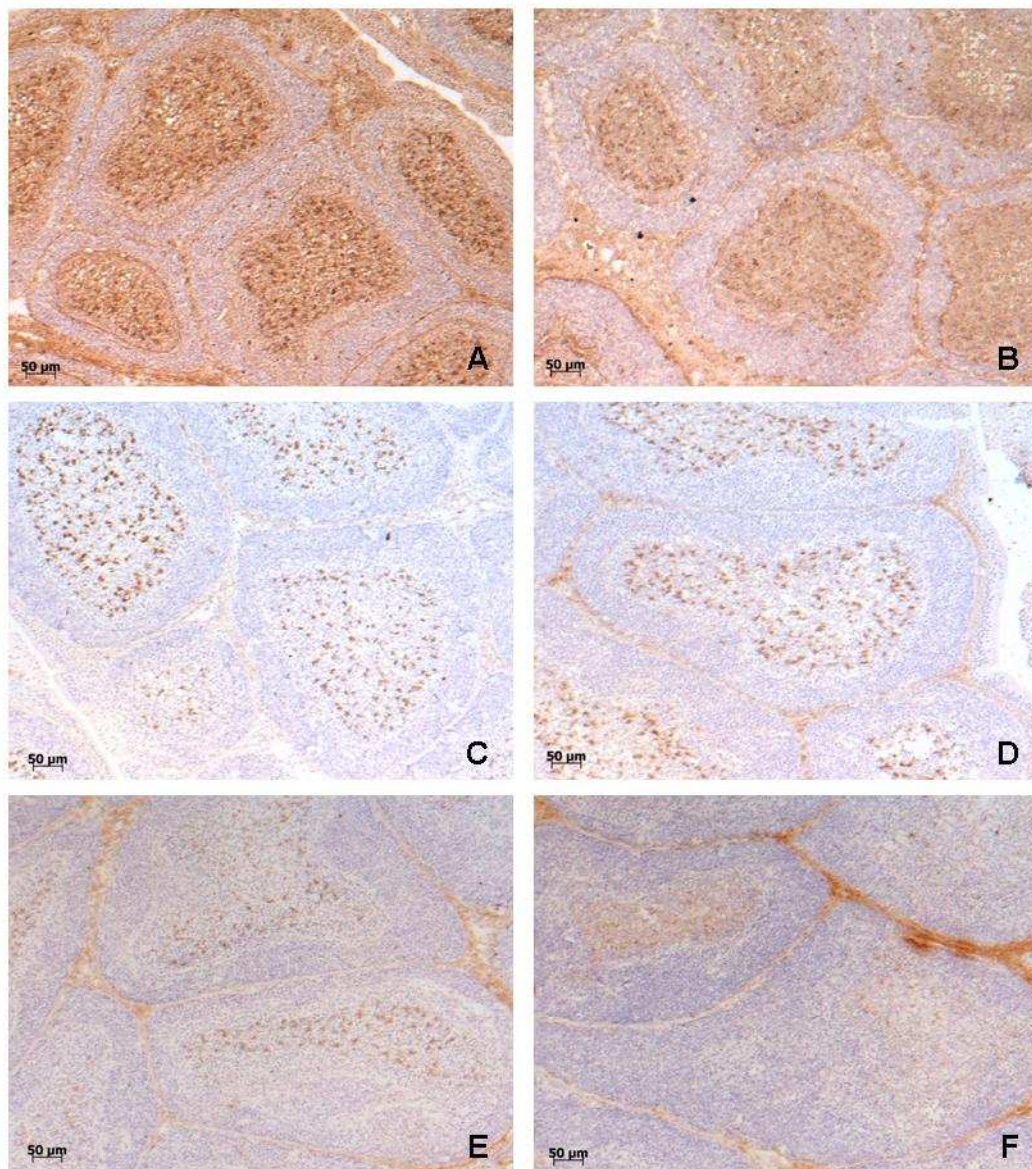


Abbildung 61: Immunhistochemische Färbung von der Bursa fabricii RCAS(BP)A-chCD40-huFc und RCAS(BP)A-transduzierten Tieren am Tag 74 (Bildtafel 2)

Bursae fabricii von RCAS(BP)A-chCD40-huFc (links) und RCAS(BP)A (rechts)-transduzierter Tiere wurden Gefrierschnitte angefertigt. Es wurden Antikörper gegen IgM (A, B), IgG (C; D) sowie IgA (E, F) eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun. Abgebildet sind jeweils repräsentative Schnitte beider Tiergruppen.

6 Diskussion

6.1 Einsatz der RCAS-Gentransfertechnologie für funktionell genomische Studien beim Huhn

Die vollständige Sequenzierung des Hühnergenoms [1] ermöglicht nun mit Hilfe transkriptomischer und proteomischer Untersuchungen die Identifizierung von Genen, welche Einfluss auf die Regulierung des Immunsystems haben könnten [5-8, 10]. Aus dieser Fülle von Informationen muss die Bedeutung einzelner Kandidatengene in nachfolgenden funktionellen Studien evaluiert werden. Hierfür bieten *in vitro*-Studien mit rekombinant hergestellten Proteinen sicherlich wertvolle Ansätze. So weisen Versuche mit einem rekombinanten chCD40L-Fusionsprotein darauf hin, dass chCD40L eventuell einen Einfluss auf die B-Zell-Differenzierung beim Huhn haben könnte. Der Einsatz dieses rekombinanten Zytokins ermöglichte erstmals die Kultur von Hühner-B-Zellen über den Zeitraum von mehreren Wochen hinweg [174]. Um jedoch eine definitive Aussage über die Funktion eines potentiellen Kandidaten treffen zu können, sind in letzter Konsequenz *in vivo*-Studien unumgänglich. Dabei sind zwei unterschiedliche Ansätze möglich. Einerseits können *in vivo*-Studien nach dem Prinzip des Funktionsgewinns (*gain of function*) durchgeführt werden. Das heißt die Überexpression des Kandidatengens soll Aufschluss über dessen physiologische Funktion liefern. Im Gegensatz dazu soll beim Prinzip des Funktionsverlusts (*loss of function*) ein teilweiser oder vollständiger Ausfall der Funktion eines Gens Hinweise auf dessen Aufgaben im Organismus geben.

Diese Prinzipien der funktionellen Genomanalyse können mit verschiedenen Technologien umgesetzt werden. Umfassende Möglichkeiten bieten transgene oder knockout Tiere. In diesen Tierlinien wird die Genmodifikation stabil von einer Generation auf die nächste weitervererbt. Die Erstellung transgener Hühner wurde zwar bereits mehrfach publiziert [2, 3, 147], im Gegensatz zum Mausmodell sind diese Techniken jedoch noch nicht soweit etabliert, dass sie routinemäßig und effizient eingesetzt werden können. Zudem ist die Erstellung transgener Linien relativ langwierig, weil die Geschlechtsreife beim Huhn erst in einem Alter von sechs bis acht Monaten eintritt [3]. Ein knockout ist beim Huhn

mit der Verfügbarkeit von embryonalen Stammzelllinien [147] und primordialen Keimzelllinien zwar nun theoretisch möglich [3, 152], von deren Erstellung wurde bisher jedoch noch nicht berichtet. Eine Alternative zu transgenen und auch knockout Tieren stellt der somatische Gentransfer dar. Hier gelangt das Transgen nicht in die Keimbahn der Tiere sondern nur in verschiedene Körperzellen. Somit wird es nicht weitervererbt. Dies kann beispielsweise mit retroviralen Vektorsystemen erreicht werden. Retroviren integrieren ihr Genom in die DNA der Wirtszelle, wo dieses mit Hilfe von Wirtsenzymen transkribiert und translatiert wird, was schließlich zur Bildung neuer infektiöser Viruspartikel führt [24]. Da jedoch kaum alle Körperzellen infiziert werden, kann die Expression des Transgens nicht im gesamten Organismus erzielt werden.

Die auf dem Rous Sarkoma-Virus basierende RCAS-Gentransfertechnologie wurde bereits in den 1980er Jahren entwickelt und in vielfältigen Studien für zellbiologische und embryologische Fragestellungen beim Huhn eingesetzt (siehe 2.1.1.3). Auch wurden damit bereits Untersuchungen zur B-Zellentwicklung an jungen Küken in den ersten Lebenstagen durchgeführt [59, 81-84]. Hierbei konnte die Expression von membranständigen Molekülen auf B-Zellen in der Bursa fabricii erreicht werden. Ob das RCAS-System jedoch auch an älteren Tieren einsetzbar ist, wurde bisher nicht untersucht. Bei Fragestellungen zu Regulationsmechanismen des Immunsystems sind Untersuchungen an jung adulten Tieren aber unverzichtbar, da Küken in den ersten Lebenswochen noch kein vollständig ausgebildetes Immunsystem haben. In dieser Arbeit erfolgten die Etablierung sowie eine umfangreiche Charakterisierung des RCAS-Gentransfersystems für die Durchführung von funktionell-genomischen Studien bei Hühnern bis hin zum jung adulten Alter. Ab der vierten Lebenswoche besitzen Hühner die Fähigkeit zur Bildung von IgM, IgA und IgG und die Struktur der Bursafollikel ist mit Rinde und Mark ist vollständig ausgebildet.

6.2 Etablierung der RCAS-Gentransfertechnologie

Um die Möglichkeit eines Einsatzes der RCAS-Gentransfertechnologie für die Durchführung von funktionell-genomischen Studien beim Huhn zu überprüfen, musste zunächst die Expression von Proteinen mit bereits bekannter Wirkung untersucht werden. Einerseits wurden hier GFP und eGFP gewählt, um die

Expression fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch erfassen zu können. Andererseits wurden die Proteine chBAFF-Flag und huBCMA-Fc exprimiert, deren Wirkungen *in vivo* schon mittels rekombinanter Proteine untersucht worden waren [12, 13, 214]. Als Negativkontrolle wurde ein Konstrukt verwendet, in dem die Sequenz für chBAFF-Flag in falscher Orientierung in den Vektor ligiert wurde (chBAFF-Flag rv) und mit dem somit kein funktionelles Protein exprimiert werden kann. Als Vektor wurde RCAS(BP)A gewählt. Dieser enthält das Gen *pol* des Hochtitertamms RSV (*Bryan*) und ermöglicht somit eine hohe Transgenexpression.

Zur Untersuchung der *in vivo*-Expression von RCAS-basiertem Protein wurden RCAS(BP)A infizierte HEF in drei Tage bebrütete Hühnerembryonen injiziert. Diese von Petropoulos et al. erstmals publizierte Methode [57] hat den Vorteil, dass das Virus nicht präpariert und konzentriert werden muss. Sie ermöglicht somit eine kürzere Zeitspanne von der Transfektion bis zum Schlupf RCAS(BP)A-transduzierter Tiere.

6.2.1 *In vitro*-Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein in HEF verschiedener Hühnerlinien

An die Klonierung der entsprechenden DNA-Sequenzen in den Vektor RCAS(BP)A (siehe 5.1.1) schlossen sich zunächst *in vitro*-Versuche zur Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein an. Erste Tests erfolgten mit den Konstrukten RCAS(BP)A-GFP und RCAS(BP)A-eGFP. Da mit diesen Vektoren transfizierte Zellen fluoreszierten, konnte von einer erfolgreichen Klonierung ausgegangen werden, aus der die Produktion funktionellen Proteins resultierte. Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl fluoreszierender Fibroblasten der Linie „0“, welche mit RCAS(BP)A-eGFP transfiziert worden waren, über drei Tage hin kontinuierlich bis auf annähernd 100% der Kultur zunahm. Dies ist auf die Bildung von vermehrungsfähigem Virus zurückzuführen, welches untransfizierte Zellen in der Kultur infiziert. Wie bereits erwähnt, ist die Replikationskompetenz des Rous Sarkoma-Virus auch im daraus entstandenen RCAS-System erhalten [48, 49]. Probleme bei der Vermehrung des Virus waren bei den verwendeten Inserts GFP und eGFP nicht zu erwarten, da deren Länge mit weniger als 800 bp weit unter der für RCAS kritischen Größe von 2000 bp liegt [38].

Zur Detektion RCAS-infizierter Zellen kann der monoklonale Antikörper AMV-3C2 eingesetzt werden, der gegen das retrovirale Protein p19 gerichtet ist [69]. In einer durchflusszytometrischen Messung konnte gezeigt werden, dass alle Zellen, welche p19 exprimieren auch das Transgen GFP exprimieren. Daher kann dieser Antikörper zuverlässig zur Detektion Transgen-exprimierender Zellen eingesetzt werden. Diese Ergebnisse passen zu jenen von Fekete et al., die ebenfalls festgestellt hatten, dass alle virusinfizierten Zellen auch das Transgen produzieren [77].

Von Hughes et al. werden für *in vitro*-Arbeiten mit RCAS-Vektoren retrovirusfreie HEF empfohlen [38]. Eigens dafür wurde die Fibroblastenlinie DF-1

etabliert [64]. Grund hierfür ist einerseits, dass bereits infizierte Zellen nicht mehr erneut infiziert werden können (Rezeptor-Interferenz) [41, 42], andererseits soll eine Rekombination des Vektors mit ähnlichen endogenen Viren verhindert werden. Für die vorliegende Arbeit standen zwar retrovirusfreie HEF der Linie „0“ zur Verfügung, jedoch war die Verfügbarkeit von befruchteten Eiern dieser Hühnerlinie limitiert. Deshalb wurde initial die Expression von RCAS(BP)A-eGFP in HEF der Linie „0“ und in HEF der kommerziell verfügbaren Linie LSL verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Expressionshöhe innerhalb der Linie LSL je nach genetischem Hintergrund äußerst variabel sein kann. Es wurden HEF aus zwei verschiedenen LSL Sublinien untersucht, die auf verschiedene Großelterntiere zurückgehen. Eine Sublinie konnte, wie auch HEF der Linie „0“, vollständig, die andere nur zu 40% mit RCAS(BP)A infiziert werden.

Dies ist wahrscheinlich auf die jeweiligen im Genom vorhandenen endogenen Retroviren zurückzuführen. Diese Viren sind stabil ins Wirtsgenom integriert und werden auch über die Keimbahn weitervererbt [34]. Ist eine Zelle bereits mit einem bestimmten ASLV-Subtyp infiziert, so ist eine erneute Infektion mit demselben Subtyp erschwert [43, 44]. Im diesem Fall dürfte in der nur zu 40% infizierbaren Linie ein Virus des Subtyps A bereits vorhanden gewesen sein, wodurch die Infektion mit RCAS(BP)A stark erschwert wurde.

6.2.2 *In vivo*-Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein

Das eigentliche Ziel dieser Studie war die Etablierung des RCAS-Vektorsystems für funktionell-genomische Studien an Hühnern. Daher war nach der *in vitro*-Expression der nächste Schritt die Infektion von Versuchstieren.

6.2.2.1 Expression von Virusprotein in verschiedenen Hühnerlinien

Da bereits in Zellkulturexperimenten ein Einfluss der verwendeten Hühnerlinie auf die Infizierbarkeit mit RCAS(BP)A sichtbar geworden war, wurde dieser auch *in vivo* überprüft. Hierfür wurden Hühnerembryonen der Linien LSL und „0“ mit RCAS(BP)A-eGFP infiziert. Bei fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung der Eihäute konnte in beiden Gruppen eine deutliche Fluoreszenz der Eihautgefäße festgestellt werden. Allerdings fluoreszierten Gefäße in den Eihäuten von LSL Embryonen weniger stark und es waren deutlich weniger positive Areale auffindbar als in Eihäuten der Linie „0“.

Um die Auswirkungen der verwendeten Hühnerlinie auf die Transgenexpression weiter zu untersuchen, wurden in *in vivo*-Versuchen die Plasmaspiegel von RCAS(BP)A-basiertem chBAFF-Flag mittels ELISA bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Plasmaspiegel der Einzeltiere bei Linie „0“ Hühnern deutlich weniger differierten als bei LSL Tieren. In Zellkulturversuchen war bereits ein deutlicher Einfluss des genetischen Hintergrundes innerhalb der Linie LSL auf die Infizierbarkeit mit RCAS(BP)A gezeigt worden. Eine Information zur genauen Abstammung der im *in vivo*-Versuch verwendeten Tiere war bei deren Erwerb nicht möglich. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass innerhalb einiger LSL-Familien endogene Retroviren des Subtyps A vorhanden sind, in anderen aber nicht. Der bereits erwähnte Mechanismus der Rezeptor-Interferenz führt dazu, dass ASLV desselben Subtyps die Zelle nicht mehr infizieren können [43, 44]. Da in den *in vitro*-Vorversuchen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Produktion von viralem Protein und Transgenproduktion festgestellt werden konnte, kann gefolgert werden dass Tiere, welche schlechter infizierbar sind, auch weniger RCAS(BP)A-basiertes Protein produzieren.

Um noch genauere Informationen zur Expression RCAS(BP)A-basierter Proteine in Linie „0“ und LSL Hühnern zu erhalten, sind Untersuchungen mittels

quantitativer RT-PCR geplant. Damit sollen die Expressionsniveaus in verschiedenen Organen beider Linien vergleichend bestimmt werden. Im Zuge dieser Versuche wird es auch möglich sein, genauere Informationen bzgl. der Höhe der Transgenexpression in den einzelnen Organen zu erhalten. Zudem soll eine histologische Untersuchung verschiedener Organe bereits mehrerer Wochen alter Linie „0“ Hühner zur Expression von viralem Protein erfolgen. In diesen Experimenten soll untersucht werden, ob in der retrovirusfreien Hühnerlinie „0“ höhere Expressionsniveaus zu erzielen sind und welche Zelltypen in dieser Hühnerlinie infiziert werden können.

Die Plasmaspiegel von RCAS(BP)A-basiertem chBAFF-Flag differierten zwischen einzelnen Tieren der Linie LSL. Für eine initiale funktionelle Untersuchung eines Kandidatengens wären jedoch möglichst homogene Plasmaspiegel des RCAS-basierten löslichen Proteins innerhalb einer Versuchsgruppe wünschenswert. Die unterschiedlichen Transgenexpressionen von Einzeltieren innerhalb der Linie LSL könnten jedoch auch in bestimmten Experimenten zur Untersuchung von Dosis-Wirkung-Effekten genutzt werden. Mit einer hohen Anzahl an infizierten Zellen sind sicherlich auch höhere Plasmaspiegel zu erreichen. Dies könnte mit der Verwendung einer retrovirusfreien Hühnerlinie erzielt werden. Da in LSL Hühnern nur bestimmte Zelltypen infiziert werden, ist die Expression intrazellulärer Proteine auf diese beschränkt. Sollte sich in den geplanten histologischen Untersuchungen an Organen von Linie „0“ Hühnern ergeben, dass hier mehr Zelltypen infiziert werden können, böte dies zusätzliche Optionen zur Untersuchung von intrazellulären Proteinen.

Des Weiteren könnte eventuell auch die Modifikation des Protokolls zur Infektion von Hühnerembryonen in einer Zunahme der infizierten Zellen resultieren. So wäre beispielsweise die gezielte Injektion in die Keimscheibe eine Option. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass sich bei solch einer direkten Manipulation die Embryosterblichkeit deutlich erhöht. Zudem besteht die Möglichkeit, konzentriertes Virus direkt in die Region von Interesse zu injizieren [77]. Jedoch sind auch hier umfangreiche Manipulationen am embryonierten Ei nötig. Bei der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode wird der Eingriff hingegen auf

ein Minimum reduziert.

In den folgenden Experimenten zur Charakterisierung der RCAS-
Gentransfertechnologie standen Tiere der Linie „0“ nicht zur Verfügung. Da auch
in der Linie LSL zufriedenstellende Plasmaspiegel von RCAS(BP)A-basiertem
chBAFF-Flag erreicht werden konnten, wurden Tiere dieser Hühnerlinie dafür
eingesetzt.

6.2.2.2 Expression von Virusprotein in Gefäßen

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Eihäuten RCAS(BP)A-
eGFP infizierter Embryonen konnte eine deutliche Fluoreszenz in den
Eihautgefäßen festgestellt werden. Auch bei Tieren nach dem Schlupf konnte mit
Hilfe einer immunhistologischen Färbung gegen das virale Protein p19 eine
deutliche Expression im Gefäßendothel dargestellt werden. Die
gewebespezifische Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein in Gefäßen
wurde hier erstmalig beschrieben, da bisher nur einzelne Organe oder
Organsysteme im Fokus der Untersuchungen standen [59, 77, 80-82]. Weitere
Zelltypen, in denen Virus nachgewiesen werden konnte, waren Zellen im
Follikelmark und interfollikuläre Zellen der Bursa fabricii sowie
Herzmuskelzellen.

Diese spezifische Infektion einzelner Zelltypen könnte an der Expression des
Rezeptors liegen, welcher für den Eintritt des Virus in die Wirtszellen benötigt
wird. Für den in dieser Arbeit verwendeten Vektor RCAS(BP)A ist der
zugehörige Rezeptor *tv-a*. Bisher wurde zwar die Bindung zwischen Retrovirus
und diesem Rezeptor genau untersucht [278-280] und auch dessen Struktur
aufgeklärt [281, 282], jedoch ist nichts über seine gewebsspezifische Expression
bekannt. Eine vorwiegende Expression von *tv-a* auf den oben genannten Zelltypen
wäre daher durchaus denkbar. Weiteren Aufschluss könnte die geplante
histologische Untersuchung an Organen von Tieren der Linie „0“ bieten. Sollten
hier dieselben Zelltypen wie bei LSL Tieren Virusprotein nachweisbar sein, wäre
dies ein Hinweis auf eine gewebsspezifische Expression von *tv-a*.

Die Expression von viralem Protein in Endothelzellen kann als großer Vorteil für
die Untersuchung von löslichen Proteinen gesehen werden. So kann eine direkte

Abgabe des Proteins ins Blut stattfinden. Damit ist auch die Verteilung im gesamten Körper gewährleistet. Dies ermöglicht ein einfaches und sicheres Erreichen der Zielstrukturen in allen durchbluteten Geweben. Das RCAS-Gentransfersystem eignet sich daher besonders gut für den Einsatz zur Untersuchung von Zytokinfunktionen, da diese in der Regel sezerniert werden und endo-, para- oder autokrin wirken [153]. Es wäre möglich, dass in Tieren der Linie „0“ noch höhere Expressionsraten erzielt werden können. Dies soll mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR geklärt werden. Zudem könnten in einem ELISA die Plasmaspiegel RCAS-basierter Proteine parallel bestimmt werden.

Weniger geeignet scheint die RCAS-Technologie für die Expression der meisten membrangebundenen oder intrazellulären Moleküle zu sein. In den durchgeführten Versuchen konnten nur spezifische Körperzellen infiziert werden, zudem kann keine gewebsspezifische Expression erreicht werden. Letzteres könnte in infizierbaren Zellen (z. B. B-Zellen) jedoch mit dem Einsatz von RCAN bzw. RCON erreicht werden, da hier ein gewebsspezifischer Promotor mit dem Insert zusammen in den Vektor kloniert werden kann [57, 58]. Sollte sich jedoch herausstellen, dass in Hühnern der Linie „0“ auch andere Zelltypen infiziert werden können, würde dies zusätzliche Möglichkeiten bieten.

6.2.2.3 Anhaltende Expression von RCAS(BP)A-basiertem Protein

Gerade für funktionell-genomische Studien an Kandidatengenen, welche eine potentielle Rolle im Hühnerimmunsystem spielen, ist es wichtig auch jung adulte Tiere untersuchen zu können, da viele Parameter des Immunsystems erst nach einigen Wochen voll funktionsfähig sind. Beispielsweise sind bei Studien von Zytokinen, welche die Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen beeinflussen könnten, die Plasmaimmunglobulinspiegel ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der B-Zell-Funktion. In bisherigen Studien zur Funktion von Hühnerzytokinen wurde rekombinant hergestelltes Protein verwendet [12-14]. Da dessen Herstellung jedoch einen großen zeitlichen, wie auch finanziellen Aufwand erfordert, ist die Verabreichung rekombinanten Zytokins nur bei kleinen Küken in den ersten Lebenstagen eine Option. Dies ist von großem Nachteil, da Tiere in dieser Altersklasse erst über eine beginnende Immunglobulinsynthese verfügen [283]. Erst im Verlauf der ersten Lebenswoche setzt die IgM-Produktion

ein, im Verlauf der zweiten Woche ist dann auch IgA im Plasma nachweisbar. Die Plasmaspiegel maternalen IgGs sinken in den ersten zwei Wochen kontinuierlich, daher kann erst ab diesem Zeitpunkt eigenes IgG nachgewiesen werden [284-286].

Um zu untersuchen, ob die RCAS-Gentransfertechnologie auch für Untersuchungen an jung adulten Tieren mit ausgebildetem Immunsystem geeignet ist, wurden Embryonen mit RCAS(BP)A-chBAFF-Flag sowie RCAS(BP)A-chBAFF-Flag rv-transduziert. Über einen Zeitraum von 62 Tagen wurden in regelmäßigen Abständen die chBAFF-Flag Plasmaspiegel im ELISA getestet. Hierbei fiel auf, dass die kurz nach dem Schlupf gemessenen Mengen an chBAFF-Flag zunächst abnahmen, sich jedoch auf einem konstanten Niveau stabilisierten, welches auch noch an Tag 62 erreicht wurde. Retroviraler Gentransfer birgt häufig das Problem, dass das Transgen nach einiger Zeit, meist auf Grund von Veränderungen der Chromatinstruktur, nicht mehr transkribiert wird (*transcriptional gene silencing*) [118, 287]. Ein solcher Mechanismus scheint jedoch in RCAS(BP)A-transduzierten Hühnern in den ersten zwei Lebensmonaten nicht in größerem Umfang statt zu finden, da chBAFF-Flag auch nach dieser Zeit noch deutlich im Plasma zu detektieren war. Auch bei der immunhistologischen Färbung von Gewebeschnitten zwei Monate alter, RCAS(BP)A-transduzierter Tiere konnte mit dem Antikörper AMV-3C2 virales Protein in gleichem Maße wie bei jüngeren Tieren nachgewiesen werden.

Der deutlich messbare chBAFF-Flag Spiegel am 62. Lebenstag sowie die Nachweisbarkeit von Virusprotein in der Immunhistochemie zeigen, dass die RCAS-Gentransfertechnologie auch für Untersuchungen an jung adulten Tieren einsetzbar ist.

6.2.3 Expression von biologisch aktivem chBAFF-Flag

Voraussetzung für den Einsatz der RCAS-Gentransfertechnologie in funktionellen *in vivo*-Studien ist, dass das in den Tieren exprimierte RCAS-basierte Protein biologisch aktiv ist. Um dies zu untersuchen, musste die Charakterisierung des RCAS-Systems an Hand eines Zytokins erfolgen, über dessen Funktion *in vivo* schon Daten vorlagen.

Die Auswirkungen einer chBAFF Überexpression sowie eines knockdowns waren an Küken bereits mit Hilfe von rekombinanten Proteinen untersucht worden [12, 13]. Hierbei wurde den Tieren in den ersten Lebenstagen chBAFF-Flag injiziert. Die tägliche Injektion bewirkte eine Erhöhung der B-Zell-Frequenzen in der Milz um bis zu 100% [13]. Um die Effekte dieses Systems mit jenen der RCAS-Technologie zu vergleichen, wurde die Sequenz für chBAFF-Flag in RCAS(BP)A kloniert. Zunächst wurden HEF der Linie „0“ mit dem hergestellten Konstrukt transfiziert. Nachdem die Expression des chBAFF-Flag Proteins im ELISA gezeigt wurde, erfolgte die Infektion von Embryonen der Linie LSL.

Es konnte bei zwei Wochen alten Tieren durch RCAS(BP)A-basiertes chBAFF-Flag ein Effekt hervorgerufen werden, welcher mit dem von injiziertem Protein vergleichbar war. Auch hier führte chBAFF-Flag zu einer Erhöhung der B-Zell-Frequenz um bis zu 100%. Diese Zunahme spiegelte sich auch in einem signifikant erhöhten Verhältnis von Milzgewicht zu Körpergewicht wieder. Jedoch war bei Milzen von RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten Tieren am Tag 63 keine erhöhte B-Zell-Zahl mehr zu beobachten. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich auch bei peripheren Blutleukozyten. Hier waren die B-Zell-Frequenzen am Tag 11 und 26 gegenüber der Kontrollgruppe noch signifikant erhöht, jedoch ging der Effekt mit zunehmendem Alter der Tiere zurück.

Ein Grund für die Reduktion der chBAFF-Wirkung könnte eine verminderte Expression des RCAS(BP)A-basierten Zytokins darstellen. Im ELISA konnte tatsächlich am Tag 11 noch ein deutlich höherer chBAFF-Flag Plasma-Spiegel gemessen werden, als am Tag 26. Jedoch pendelte sich der chBAFF-Flag Spiegel danach auf einem konstanten Niveau ein. Eine Immunreaktion gegen das Virus hingegen ist relativ unwahrscheinlich, da eine Infektion am Embryonaltag 3 zur Toleranzbildung gegen das Virus führen müsste [34]. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass im Rahmen eines Feedback Mechanismus, die Produktion endogenen chBAFFs verringert wird. Dies würde erklären, warum bei einem gleichbleibenden Plasmaspiegel an chBAFF-Flag der Effekt reduziert ist. *In vitro* wie *in vivo* konnte eine Wirkung von rekombinantem chBAFF-Flag auf reife B-Zellen in der Milz und den Zäkaltonsillen gezeigt werden [12, 13]. Als weitere Funktion dieses Zytokins beim Huhn ist, anders als beim Säuger, die Steigerung

der Überlebensdauer naiver B-Zellen in der Bursa fabricii beschrieben [12]. Um den Schlupf beginnt die Emigration von B-Zellen aus diesem primären lymphatischen Organ in die Peripherie. Diese hält bis zur Involution der Bursa fabricii an [288]. Das Organ beginnt bereits ab einem Lebensalter von 8 bis 10 Wochen an Gewicht zu verlieren, bis es schließlich mit dem Einsetzen der Geschlechtsreife im Alter von 20 bis 28 Wochen vollständig atrophiert [289]. Den Hauptanteil (ca. 60%) der emigrierenden B-Lymphozyten macht eine Population aus dem Follikelkortex aus, wo auch nach dem Schlupf noch Zellproliferation stattfindet. Diese Zellen sind in der Peripherie mit einer mittleren Überlebensdauer von ca. 30 Stunden relativ kurzlebig [288]. Eine Abnahme der chBAFF-Flag Wirkung mit zunehmendem Alter der Tiere könnte auch damit erklärt werden, dass das Zytokin besonders das Überleben jener bursalen B-Zellen beeinflusst, aus denen diese kurzlebigen peripheren B-Zellen hervorgehen. Nähere Informationen hierzu könnte eine von Paramithiotis et al. beschriebene *in situ* Markierung von Bursazellen mit anschließender Bursektomie ergeben [288]. Hierbei könnte man an Hand der Überlebensdauer der markierten, also frisch aus der Bursa ausgewanderten B-Zellen im Blut RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierter und Kontrolltiere die Größe der genannten B-Zell-Population bestimmen.

Als weiterer Aspekt der B-Zell-Funktion wurden auch die Auswirkungen der chBAFF-Flag-Expression auf die Antikörperspiegel im Plasma transduzierter Tiere untersucht. In bisherigen Studien mit rekombinantem Protein konnten nur Aussagen bzgl. der Produktion von IgM getroffen werden, da in diesen Studien junge Küken verwendet wurden, welche noch hohe Spiegel an maternalem IgG aufwiesen und kaum eigenes IgG und IgA produzierten [214]. ChBAFF-Flag Injektionen führten zu signifikant erhöhten IgM-Plasmaspiegeln bei Tieren in einem Alter von 10 Tagen. Der Einsatz des RCAS-Systems ermöglichte nun auch die Untersuchung der Plasmainmunglobulinspiegel über einen längeren Zeitraum hinweg bis zu einem Lebensalter von 62 Tagen. RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierte Tiere zeigten im Mittel höhere IgM- und IgA-Spiegel im Plasma, wobei auch diese Effekte zum Versuchsende hin nicht mehr signifikant waren. Das Plasma-IgG war zeitweise erhöht. Hier besteht eine Parallele zum Säuger, denn auch BAFF transgene Mäuse weisen signifikante Erhöhungen aller

Plasmainmunglobuline auf [203].

Mit Hilfe der RCAS-Technologie bestand erstmals die Möglichkeit, die Auswirkungen einer chBAFF-Überexpression auf die Bildung von antigenspezifischen Antikörpern zu untersuchen, weil nun Tiere untersucht werden konnten, welche bereits ein ausgebildetes Immunsystem mit der Fähigkeit zu einer humoralen Immunantwort besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass nach Immunisierung mit dem T-Zell-abhängigen Antigen KLH zwar die Menge an antigenspezifischem IgM, nicht aber antigenspezifischem IgG erhöht war. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu jenen an BAFF transgenen Mäusen, welche keine erhöhten antigenspezifischen IgM-Titer, wohl aber erhöhtes antigenspezifisches IgG aufwiesen [204]. Bei der Maus wurde ein Einfluss des Zytokins auf den Klassenwechsel zu IgG₁ und IgA festgestellt [201]. Es wäre möglich, dass auch chBAFF den Immunglobulinklassenwechsel beeinflusst.

In histologischen Färbungen von Milzen und Bursae fabricii von RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierten und Kontrolltieren am 14. und 63. Lebenstag konnte kein mikroskopisch sichtbarer Unterschied festgestellt werden. B-Zellen der Bursa fabricii zeigten jedoch in Kultur unter chBAFF-Flag Einfluss eine signifikant erhöhte Lebensdauer [12]. Auch wurde auf bursalen B-Zellen eine hohe Expression von chBAFF-R gezeigt [213]. Beides weist darauf hin, dass B-Zellen der Bursa fabricii grundsätzlich sensitiv für chBAFF sind. Da in diesem Organ jedoch auch eine hohe Expression von endogenem chBAFF festgestellt werden konnte [12], liegt die Vermutung nahe, dass eine weitere Erhöhung des chBAFF-Spiegels keine zusätzliche Wirkung mehr erzielen kann, da die Zahl der Rezeptoren begrenzt und eventuell bereits gesättigt ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit der RCAS-Gentransfertechnologie die Expression von biologisch aktivem Protein über einen Zeitraum von zwei Monaten erzielt werden kann. Die Untersuchung ermöglichte neue Erkenntnisse zum Einfluss von chBAFF auf die Antikörperspiegel im Plasma.

6.2.4 Knockdown von endogenem chBAFF mit dem löslichen Rezeptor huBCMA-Fc

Für funktionell-genomische Studien sind neben einer Überexpression auch der teilweise oder totale Ausfall der Kandidatengenfunktion relevante Fragestellungen. Dies kann einerseits erreicht werden, indem Transkription oder Translation mittels Gen knockout oder RNA-Interferenz unterbunden werden. Die knockout Technologie ist für das Huhn seit der Etablierung von embryonalen Stammzell- [147] und primordialen Keimzelllinien [3, 152] zwar nun theoretisch möglich, jedoch noch nicht etabliert und daher von der routinemäßigen Anwendung noch weit entfernt. Mittlerweile am Hühnerorganismus etabliert ist die RNA-Interferenz (*RNAi*) Technologie. Hierbei führen kurze doppelsträngige RNA Moleküle, sog. „*short interfering RNAs*“ (*siRNA*) zur Degradierung von komplementärer mRNA und verhindern somit die Translation des entsprechenden Proteins. Auch hierfür wurde in den letzten Jahren vermehrt die RCAS-Gentransfertechnologie eingesetzt (siehe 2.1.1.3).

Ein anderer Ansatz für Studien nach dem Prinzip des Funktionsverlusts ist die Expression von löslichen Faktoren, welche das Protein von Interesse neutralisieren. Hierfür eignen sich einerseits spezifische monoklonale Antikörper. Cihak et al. setzten erfolgreich Antikörper gegen den T-Zell-Rezeptor des Huhns für eine Depletion dieser Zellpopulation ein [290]. Andererseits werden zur Neutralisierung von Proteinen auch lösliche Rezeptormoleküle verwendet. In früheren Versuchen zur Funktion des Zytokins chBAFF wurde ein knockdown mittels Injektion des chBAFF bindenden, löslichen Rezeptormoleküls huBMCA-Fc erreicht [12]. Die so behandelten Küken zeigten verminderte B-Zell-Zahlen in der Milz. Histologisch konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der B-Zell-Follikel in der Bursa fabricii behandelter Hühnerembryonen stark vermindert war. Da die Tiere jedoch nur über den Zeitraum von einer Woche mit rekombinantem huBCMA-Fc behandelt wurden, konnten keine Aussagen über den Einfluss bei älteren Tieren getroffen werden.

Um zu untersuchen, ob auch mit dem Gentransfersystem RCAS eine funktionelle Inhibition eines Moleküls herbeigeführt werden kann, wurde die Sequenz von huBCMA-huFc in RCAS(BP)A kloniert. Die mit diesem Konstrukt transduzierten

Küken zeigten ebenso, wie die mit rekombinantem Protein behandelten Tiere, verminderte B-Zell-Zahlen in der Milz. Da die huBCMA-Fc exprimierenden Tiere bis zu einem Alter von 16 Tagen untersucht wurden, war es nun auch möglich, genügend Blut für durchflusszytometrische Analysen der Leukozytenpopulationen zu gewinnen. Auch im Blut zeigten die RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten Tiere um ca. 50% verminderte B-Zell-Zahlen. Zudem konnten nun neben den Bursae fabricii auch die Milzen der Tiere histologisch untersucht werden, um eventuelle Auswirkungen auf die Struktur dieses Organs zeigen zu können. In den Milzen RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierter Küken waren kaum B-Zellen zu finden. In der Hühnermilz sind die B-Zell-Areale in typischer Weise um die T-Zell-Zonen herum angeordnet [283]. Diese Struktur war in den Milzen von RCAS(BP)A-huBCMA-Fc-transduzierten Hühnern weitgehend nicht ausgebildet.

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die RCAS-Gentransfertechnologie nicht nur die Möglichkeit einer Überexpression von Kandidatengenen bietet, sondern auch mittels Expression von neutralisierenden Faktoren funktionelle knockdowns herbeigeführt werden können.

6.3 Auswirkungen einer Infektion mit RCAS(BP)A

Da bei der Transduktion mit RCAS-Vektoren vermehrungsfähiges Virus übertragen wird, musste geklärt werden, ob die retrovirale Infektion an sich Veränderungen im Immunsystem der Versuchstiere hervorruft.

Tumor auslösende Retroviren können auf Grund ihrer Eigenschaften in akut und langsam transformierende Vertreter unterteilt werden. Akut transformierende Viren besitzen neben den retroviralen Genen *gag*, *pol* und *env* zusätzlich Onkogene (z. B. *src*). Diese kodieren für Proteine, die durch Eingriffe in Zellwachstum und -differenzierung Tumore hervorrufen können. Langsam transformierende Retroviren hingegen enthalten kein virales Onkogen. Eine Transformation der Wirtszellen wird durch die Integration viraler DNA ins Wirtsgenom hervorgerufen und Tumore treten erst lange Zeit nach der Virusinfektion auf [24, 34]. Langsam transformierende Vertreter der ASLV rufen bei Hühnern vorwiegend lymphoide Leukosen hervor, welche sich üblicherweise erst in einem Alter von

mehreren Monaten klinisch manifestieren [34]. Ursache für die Transformation der Wirtszellen ist hierbei die Integration des Provirus in der Nähe des zellulären Onkogens *myc* [24, 291]. Dies geschieht jedoch nur in wenigen Fällen. Obwohl ASLV in Geflügelbeständen weit verbreitet sind, führen Infektionen nur in 1-2% der Fälle zur Erkrankung [34]. Zusätzlich besteht theoretisch die Möglichkeit, dass das Transgen in den Lokus eines Gens inseriert, welches wichtige Aufgaben in der Regulation des Zellzyklus übernimmt und dessen Zerstörung eine neoplastische Entartung der Wirtszelle begünstigt.

Wie bereits erwähnt, wurde bei der Entwicklung des RCAS-Systems das Onkogen *src* aus dem ursprünglichen Rous Sarkoma-Virus entfernt [48, 49]. Daher fehlt RCAS die Fähigkeit zur akuten Transformation der Wirtszellen. Je nach der Insertionsstelle im Wirtsgenom wäre jedoch eine langsame Transformation durchaus denkbar. Die in den Versuchen verwendeten Hühner sind aber mit zwei Monaten noch zu jung, um eine klinisch manifeste Leukämie auszubilden. In erkrankten Tieren vermehren sich transformierte Lymphozyten in den Follikeln der Bursa fabricii [291]. Obwohl bei histologischen Untersuchungen von Bursae fabricii RCAS(BP)A-transduzierter Hühner keine neoplastischen Veränderungen einzelner Follikel festgestellt werden konnten, kann diese nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Nähere Informationen könnte beispielsweise die Verwendung eines Antikörpers gegen das Protein des zellulären Onkogens *myc* in Histologie oder Durchflusszytometrie liefern. Außerdem könnten langfristige Versuche bis zu einem Alter von 10 Monaten durchgeführt werden.

Bei einem Vergleich der Leukozytenpopulationen von RCAS(BP)A (ohne Insert)-transduzierten Tieren mit denen einer unbehandelten Kontrollgruppe wiesen diese in Milz, Knochenmark und Thymus keine biologisch relevanten Unterschiede auf. Jedoch fiel auf, dass die B-Zell-Frequenzen im Blut der RCAS(BP)A-transduzierten Tiere über den gesamten Versuchszeitraum erhöht waren. Auch eine Messung der absoluten Leukozytenzahlen im Vollblut an Tag 73 ergab eine signifikante Erhöhung der B-Zell-Zahl. Eine Immunreaktion gegen das produzierte Virus ist dabei jedoch relativ unwahrscheinlich, da eine Infektion am 3. Embryonaltag eine Toleranz hervorrufen müsste [34].

Die Erhöhung der B-Lymphozyten Frequenz in RCAS(BP)A-transduzierten Hühnern kann mit den bisher durchgeführten Untersuchungen nicht ausreichend geklärt werden. In weiteren Untersuchungen sollte ein besonderes Augenmerk auf eine eventuelle beginnende Transformation von B-Zellen gelegt werden. Neben weiteren histologischen Untersuchungen könnten, derzeit am Institut für Tierphysiologie durchgeführte, Transkriptom- und Proteomanalysen der Bursa fabricii weitere Hinweise hierzu liefern. In diesen Studien entdeckte Kandidatengene könnten bei RCAS-transduzierten und Kontrolltieren vergleichend untersucht werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, im Folgenden mit RCAS(BP)A-Vektor (ohne Insert)-transduzierte Tiere als Kontrollgruppe eingesetzt, da ein Zytokinsystem mit potentielltem Einfluss auf die B-Zell-Differenzierung untersucht werden sollte.

6.4 Funktionelle *in vivo*-Studien am CD40/CD40L-System des Haushuhns

Die Verwendung der RCAS-Gentransfertechnologie für *in vivo*-Studien zur Funktion des Zytokins chBAFF zeigte, dass damit aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden können. Die etablierte Technik sollte nun für Studien an einem weiteren Zytokin/Ligand-System eingesetzt werden. Hierfür wurde das CD40/CD40L-System des Haushuhns gewählt. Dies geschah einerseits um die Anwendbarkeit der RCAS-Technologie an einem weiteren System zu überprüfen. Andererseits sollte jedoch auch die Funktion des CD40/CD40L-Systems *in vivo* untersucht werden, da an diesem System beim Haushuhn bisher nur *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt worden waren.

Die Sequenzen für das Zytokin und den zugehörigen Liganden waren bereits publiziert [174, 175]. Mit Hilfe eines rekombinanten chCD40L-Fusionsproteins waren bereits umfangreiche *in vitro*-Untersuchungen zur Wirkung von chCD40L auf Hühner-B-Zellen durchgeführt worden, in denen ein Einfluss von chCD40L auf kultivierte B-Zellen festgestellt wurde. Lösliches chCD40L-Fusionsprotein bewirkte eine massive Proliferation. So gelang es mit diesem Zytokin erstmalig, B-Zellen über mehrere Wochen hinweg zu kultivieren [174]. Der zugehörige Rezeptor wurde unter anderem auf B-Zellen der Bursa fabricii gefunden [174, 175]. Zur Untersuchung von *in vivo*-Funktionen des CD40/CD40L-Systems beim Huhn wurde der Ansatz eines funktionellen knockdowns gewählt. Dieser sollte, ähnlich dem Ansatz des chBAFF knockdowns mit huBCMA-Fc, mit einem löslichen Rezeptormolekül durchgeführt werden. Hierfür wurde ein Fusionsprotein aus dem extrazellulären Teil des chCD40-Moleküls und einem humanen Fc-Teil erstellt und in RCAS(BP)A kloniert.

Das menschliche X-chromosomal rezessiv vererbte Hyper-IgM-Syndrom des Menschen gab schon in der Anfangsphase der Erforschung des CD40/CD40L-Systems wertvolle Hinweise auf dessen physiologische Funktionen [219]. Für die weitere Erforschung wurden auch Maus knockout Linien erstellt [243, 244]. Ähnliche Hinweise auf physiologische Funktionen des CD40/CD40L-Systems beim Huhn sollte auch der mit RCAS(BP)A erstellte funktionelle chCD40L-

knockdown liefern.

Um die Funktionalität des gewählten Ansatzes zu überprüfen, musste zunächst die Bindung des hergestellten chCD40-huFc Moleküls an chCD40L *in vitro* sichergestellt werden. Für die Tests wurde chCD40-huFc haltiger Zellkulturüberstand eingesetzt. Die Interaktion von chCD40-huFc mit seinem Liganden wurde im ELISA nachgewiesen. Außerdem wurde die Bindung von chCD40L-Fusionsprotein an chCD40 auf der Oberfläche von HD11-Zellen durch chCD40-huFc haltigen Zellkulturüberstand inhibiert. Schließlich wurde noch die chCD40L induzierte proliferation von Milz-B-Zellen durch chCD40-huFc gehemmt.

6.4.1 Auswirkung von chCD40-huFc auf B-Zell-Frequenzen

Im ELISA wurde nachgewiesen, dass RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierte Tiere das gewünschte Protein produzierten. Somit gelang ein RCAS-vermittelter, somatischer Gentransfer mit einem weiteren löslichen Protein. Im weiteren Verlauf des Versuchs wurden die verschiedenen Populationen an Blutleukozyten der RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Tiere und einer RCAS(BP)A-transduzierten Vergleichsgruppe über mehrere Wochen hinweg in regelmäßigen Abständen analysiert. Hierbei zeigten Tiere der chCD40-huFc Gruppe verminderte

B-Zell-Frequenzen. Diese Reduktion wurde jedoch erst ab dem 46. Versuchstag signifikant. Bei einer Messung von absoluten Zellzahlen im Vollblut am Tag 73 konnte die Reduktion der B-Lymphozyten bestätigt werden. Bei der Analyse der Leukozytenfrequenzen von Milz und Knochenmark am Tag 74 konnten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden werden. Jedoch war das Gewicht der Bursa fabricii im Verhältnis zum Körpergewicht der Tiere signifikant vermindert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die reduzierten B-Zell-Frequenzen im Blut der RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Tiere damit im Zusammenhang stehen.

Mit dem Schlupf beginnt die Auswanderung bursaler B-Zellen in die Peripherie, welche bis zur Involution dieses Organs anhält. Hierbei gibt es zwei Populationen an B-Zellen. Einerseits gibt es kurzlebige B-Zellen, welche beim juvenilen Tier

ca. 60% der B-Zellen im Blut ausmachen. Diese Zellen stammen aus der Follikelrinde [288]. Andererseits gibt es eine Population an B-Zellen, welche im Blut eine Lebensdauer bis zu 12 Tagen aufweist. Die Entwicklung dieser, aus dem Follikelmark stammenden B-Zellen, scheint in Abhängigkeit von Antigen aus dem Darm und dem Blut zu erfolgen [292]. Das Follikelmark übernimmt bei jung adulten Tieren auch die Aufgabe eines sekundären lymphatischen Organs [293, 294].

Die *in vitro*-Untersuchungen am CD40/CD40L-System des Huhnes, weisen auf eine Funktion bei der Aktivierung und auch bei der weiteren Differenzierung von B-Zellen hin [174]. Vereint man diese Ergebnisse, mit den oben erwähnten Erkenntnissen zur Entwicklung bursaler B-Zellen nach dem Schlupf, so liegt die Vermutung nahe, dass ein funktioneller Block der CD40/CD40L Interaktion primär die medullären B-Zellen beeinflusst. Auch diese wandern ab dem Schlupf in die Peripherie aus. Eine Reduktion dieser Zellen durch chCD40-huFc könnte einen Grund für die verminderten B-Zell-Frequenzen im Blut der Tiere darstellen.

Daher wurde in immunhistochemischen Färbungen die Struktur und Zellzusammensetzung der Organe verglichen. Die Expression von chCD40-huFc schien keine Auswirkungen auf die mikroskopische Struktur der Bursae fabricii zu haben, da im Vergleich zur Kontrollgruppe weder ein Unterschied in der Organisation des Organs noch eine augenfällige Größenveränderung entdeckt werden konnten. Auch eine Färbung mit dem Antikörper BB3, mit welchem die kortikomedulläre Grenzschicht dargestellt werden kann [277], zeigte keine strukturellen Unterschiede. Eine Färbung mit dem Antikörper Bu1 gegen das B-Zell-Antigen chB6 zeigte keine sichtlichen Veränderungen bei chCD40-huFc-transduzierten Tieren. Zusätzlich wurde die Expression der verschiedenen Immunglobulinmoleküle

histologisch untersucht. IgM-positive Zellen waren, wie zu erwarten, in Follikelcortex und –medulla zu finden. In der Bursa fabricii ist IgM auf der Zelloberfläche für das Überleben von B-Zellen nach dem Schlupf essentiell [85, 295]. IgG- und IgA-positive Zellen konnten vornehmlich in der Medulla nachgewiesen werden. Dies entspricht weitgehend den Angaben in der Literatur [292]. Hierbei könnte es sich aber nicht nur um B-Zellen handeln, sondern auch

um bursale dendritische Zellen, welche die Antikörper auf ihrer Oberfläche gebunden haben. Es konnte auch in der Färbung mit Antikörpern gegen die verschiedenen Immunglobuline kein mikroskopisch sichtbarer Unterschied zwischen den Organen der beiden verglichenen Gruppen festgestellt werden.

An dieser Stelle könnte eine nähere Untersuchung zur Expression von chCD40 in der Bursa fabricii weitere Informationen über die Verteilung dieses Rezeptors in Mark und Rinde liefern. Der Antikörper BB3 ermöglicht eine genaue Unterscheidung zwischen Kortex und Medulla der Bursafollikel. Dies könnte man in der Laser-Dissektions-Mikroskopie nutzen. So könnten hier Rinde und Mark isoliert werden und die so erhaltenen Zellen mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression von chCD40 untersucht werden. Zudem könnte auch hier die bereits erwähnte Technik der *in situ* Markierung bursaler B-Zellen zur Anwendung kommen [288]. So könnte untersucht werden, welche B-Zell-Population im Blut durch RCAS(BP)A-basiertes chCD40-huFc beeinflusst ist.

6.4.2 Auswirkungen von chCD40-huFc auf Immunglobulinspiegel

Um den Einfluss von chCD40-huFc auf Hühner B-Zellen weiter zu beurteilen, wurde von RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Tieren und einer RCAS(BP)A-transduzierten Kontrollgruppe in regelmäßigen Abständen Plasma zur Bestimmung der Gesamtimmunglobulinspiegel gewonnen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Tiere der RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Gruppe in der zweiten Hälfte des Versuchszeitraums im Mittel geringere Antikörperspiegel aufwiesen. Diese Unterschiede waren jedoch für IgM nur an den Tagen 46 und 73 sowie für IgA am Tag 31 signifikant. Dies korreliert mit der geringeren B-Zell-Frequenz dieser Tiere im selben Zeitraum.

Auffällig ist, dass die RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Tiere keine erhöhten IgM-Spiegel aufwiesen, so wie dies bei Menschen mit X-chromosomal rezessiv vererbtem Hyper-IgM-Syndrom der Fall ist [242]. Jedoch ist dies auch bei CD40L knockout Mäusen nicht zu beobachten [243, 244]. Weitere Symptome des Verlusts der CD40L Funktion sind bei Mensch und Maus erniedrigte IgG-, IgA- und IgE-Plasmaspiegel. Grund dafür ist die essentielle Aufgabe von CD40L beim Immunglobulinklassenwechsel [173, 256]. Auch *in vitro*-Versuche beim

Huhn weisen eigentlich auf einen Einfluss von chCD40L beim Klassenwechsel hin. Mit chCD40L kultivierte B-Zellen aus KLH-immunisierten Hühnern zeigten eine gesteigerte Produktion an antigenspezifischem IgM und IgG [174]. Interessanterweise wurde um 1980 mehrfach von einer Hühnerlinie berichtet, deren Tiere erhöhte IgM-Spiegel, jedoch kaum IgG aufwiesen, also ähnliche Symptome wie Menschen mit X-chromosomal rezessiv vererbtem Hyper-IgM-Syndrom zeigten [258, 259]. Da damals kaum Kenntnisse über den Einfluss von Zytokinen auf die B-Zell-Entwicklung und Techniken zu deren Untersuchung vorlagen, konnte das Syndrom in dieser Hinsicht nicht näher charakterisiert werden. Vom heutigen Standpunkt aus aber läge sicherlich die Vermutung nahe, dass diese Tiere einen Defekt im CD40/CD40L-System aufweisen könnten.

Ein mit Mensch und Maus vergleichbarer Effekt auf IgG und IgA im Plasma, war bei der RCAS(BP)A-chCD40-huFc-transduzierten Gruppe in der zweiten Hälfte der Versuchsphase durchaus zu beobachten. Der erwartete Effekt mit Symptomen, ähnlich denen in Mensch und Maus sowie der oben beschriebenen Hühnerlinie, blieb hierbei jedoch aus. Als Grund dafür wäre denkbar, dass die Plasmaspiegel an chCD40-huFc zu gering sind, um die Symptome eines vollständigen knockouts hervorzurufen. Sollte sich die Vermutung bestätigen, dass sich in Hühnern der Linie „0“ höhere Expressionsraten erzielen lassen, wäre eine Wiederholung des Versuchs mit diesen Tieren sicherlich sinnvoll. Auch sollten die Plasmaspiegel KLH spezifischer Antikörper noch näher untersucht werden, um weitere Informationen über den Einfluss von chCD40-huFc auf den Immunglobulinklassenwechsel zu erhalten.

6.4.3 Mögliche weitere Schritte zur Charakterisierung des CD40/CD40L-Systems beim Haushuhn

Mit den vorliegenden Ergebnissen der durchgeführten *in vivo*-Versuche kann die Vermutung untermauert werden, dass das CD40/CD40L-System des Huhns die Differenzierung von B-Zellen beeinflusst. Ein Einfluss des funktionellen chCD40L knockdowns auf periphere Organe konnte jedoch nicht gezeigt werden. Möglich wäre, dass die Plasmaspiegel an RCAS(BP)A-basiertem chCD40-huFc zu gering waren, um eine Wirkung in peripheren Organen zu erzielen, die Konzentration in bursalen B-Zellen jedoch genügte um hier einen Effekt zu

erzielen. Hier würde eine Untersuchung der Höhe der Transgenexpression mittels quantitativer RT-PCR weitere Informationen liefern. Eine zusätzliche Option, um den Verlust der chCD40L-Funktion zu studieren, wären RNA-Interferenz Studien. Ein sicherer vollständiger Funktionsverlust ist jedoch nur mittels eines Gen knockouts herbeizuführen.

In weiteren *in vivo*-Untersuchungen zu den Auswirkungen eines chCD40L knockdowns könnte dessen Einfluss auf die Bildung germinaler Zentren in der Milz des Huhns genauer untersucht werden. Auch bei Mensch und Maus liegt eine Hauptaufgabe dieses Systems in der Induktion und Aufrechterhaltung germinaler Zentren [173, 250]. Ein nächster Schritt zur genaueren Untersuchung der *in vivo*-Funktion des CD40/CD40L-Systems beim Huhn wäre die Überexpression eines löslichen chCD40L-Fusionsproteins mittels der RCAS-Gentransfertechnologie.

CD40L wird für mehrere Spezies als potentiell Adjuvans gehandelt. So wurden beispielsweise beim Schaf und bei der Ente schon Vakzinierungsversuche durchgeführt [296, 297]. Sollte sich in Immunisierungsversuchen eine Auswirkung von chCD40L auf die B-Zell-medierte Immunantwort *in vivo* bestätigen, könnte auch hier chCD40L als mögliches Adjuvans in Betracht gezogen werden.

6.5 Zukünftiger Einsatz der RCAS-Gentransfertechnologie in funktionell-genomischen Studien beim Haushuhn

In der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung der RCAS-Gentransfertechnologie für funktionell-genomische Studien an jung adulten Hühnern gezeigt. Es konnten innerhalb kurzer Zeit Transgen-exprimierende Tiere generiert werden, die biologisch aktives Protein über einen Zeitraum von mindestens zwei Monaten produzieren. Dabei beläuft sich die minimale Dauer von der ersten Transfektion von HEF bis zum Schlupf der Tiere auf ca. fünf Wochen. Die Erstellung von Keimbahn-transgenen Hühnern mittels lentiviraler oder zellbasierter Verfahren übersteigt diese Zeitspanne bei weitem, da die transgenen Linien erst nach der Zuchtreife der initial erstellten Mosaiken generiert werden können. Des Weiteren scheint der somatische Gentransfer mittels RCAS

relativ effizient zu sein, da in allen Versuchen 100% der geschlüpften RCAS(BP)A-transduzierten Tiere das Transgen exprimierten. Die vorwiegende Expression von viralem Protein im Gefäßendothel macht dieses System besonders für lösliche Proteine geeignet. Möglich wäre der Einsatz der RCAS-Gentransfertechnologie nicht nur für Zytokine oder lösliche Rezeptoren, wie in dieser Arbeit gezeigt, auch ein Einsatz zur Expression von Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Antikörpern wäre durchaus denkbar.

Die Versuche zeigten jedoch, dass die Produktion RCAS(BP)A-basierten Proteins stark von der verwendeten Hühnerlinie abhängt. So war die Höhe der Plasmaspiegel von RCAS(BP)A-basiertem Protein in Tieren der Linie LSL relativ unterschiedlich. Im Gegensatz dazu wiesen Tiere der retrovirusfreien Linie „0“ homogene Plasmaspiegel an RCAS(BP)A-basiertem Zytokin auf. Um einheitliche Expressionsraten zu erreichen, sollte daher möglicherweise für die Zukunft die routinemäßige Verwendung von retrovirusfreien Hühnerlinien (z. B. Linie „0“) in Erwägung gezogen werden. In Hühnern der Linie LSL war die Expression von viralem Protein auf bestimmte Zellen beschränkt. Daher ist der Einsatz des RCAS-Systems zur Untersuchung membranständiger oder intrazellulärer Proteine in dieser Hühnerlinie relativ begrenzt. Die zellspezifische Expression in Hühnern der retrovirusfreien Linie „0“ wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. Es ist durchaus möglich, dass in diesen Tieren eine umfangreichere Infektion stattfindet. Zusätzliche Versuche bzgl. der Transgenexpression in verschiedenen Hühnerlinien, aber auch bzgl. der Expressionshöhe in einzelnen Organen, beispielsweise mittels Immunhistologie und quantitativer RT-PCR, sind daher geplant. Umfassende Möglichkeiten würde eine transgene Hühnerlinie bieten, welche einen der Rezeptoren für ASLV (z. B. *tv-a*) überexprimiert. In diesen Tieren könnte man mit RCAS-Vektoren in allen Körperzellen hohe Expressionsraten von Proteinen verschiedenster Art erreichen.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann die RCAS-Gentransfertechnologie als exzellentes Werkzeug für funktionell-genomische Studien beim Huhn bestätigt werden. Deren Vorteile liegen vor allem in der einfachen Anwendung und der kurzen Dauer bis zum Erhalt Transgen exprimierender Tiere. Daher ist sie für erste *in vivo*-Untersuchungen zur Funktion bestimmter Gene besonders geeignet.

Im Rahmen von Datenbankrecherchen wie auch in Transkriptom- und Proteomanalysen wird eine Fülle von Kandidatengen identifiziert, deren Funktion in nachfolgenden funktionellen Studien näher bestimmt werden muss. Ein mögliches Ablaufschema zur Durchführung funktionell-genomischer Studien beim Huhn ist in Abbildung 62 dargestellt.

Das Gen für das Zytokin chBAFF wurde beispielsweise mittels Homologiesuche in einer EST Datenbank identifiziert (Abbildung 62A). Nach dessen Klonierung und Expression (Abbildung 62B) folgten *in vitro*-Untersuchungen (Abbildung 62C), an Hand derer sich eine eventuelle Relevanz dieses Gens für das Hühnerimmunsystem bereits abzeichnete. Auf Grund dieser Ergebnisse erfolgte eine weitere Charakterisierung der Zytokinfunktion *in vivo* (Abbildung 62D). Hierbei wurden zunächst Untersuchungen mit Hilfe von rekombinant hergestelltem chBAFF-Flag und dem chBAFF neutralisierenden, löslichen Rezeptor huBCMA-Fc durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe der RCAS-Technologie weitere Erkenntnisse zur *in vivo*-Funktion von chBAFF gewonnen werden.

Da jedoch weitere Fortschritte bei der Etablierung von Techniken zur Erstellung Keimbahn-transgener und knockout-Hühner absehbar sind, werden diese für detaillierte funktionell-genomische Studien in Zukunft mehr an Bedeutung gewinnen (Abbildung 62E). Auf Grund seiner einfachen und schnellen Anwendbarkeit, könnte das RCAS-System hier als Werkzeug für ein Screening zur Erstellung transgener Tiere dienen.

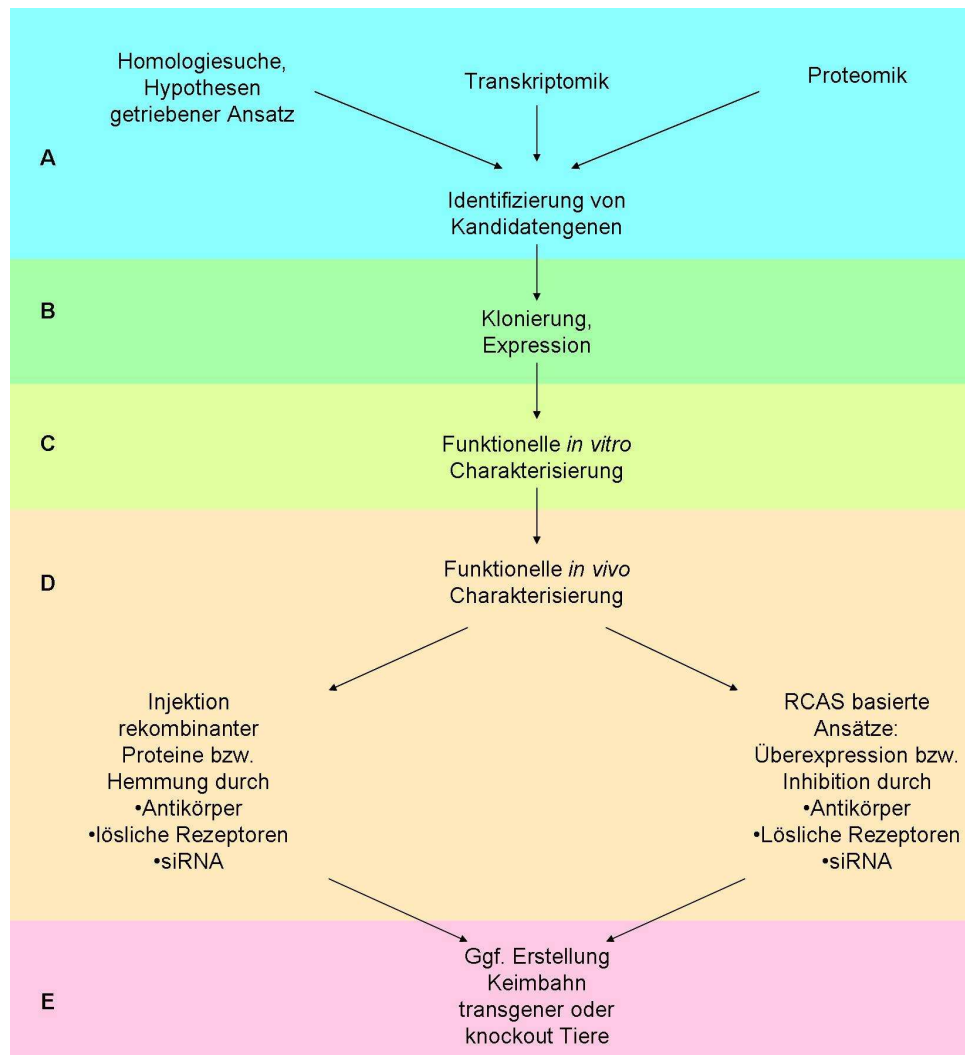


Abbildung 62: Schema für die Durchführung funktionell-genomischer Studien beim Haushuhn

7 Zusammenfassung

Die Sequenzierung des Hühnergenoms hat zur Identifizierung zahlreicher bisher unbekannter Gene geführt, darunter auch solcher, die möglicherweise eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems spielen. Ziel zukünftiger Arbeiten ist es, die Funktion dieser Gene zu analysieren, wobei zunächst sicherlich *in vitro*-Systeme genutzt werden. Letztlich gilt es aber, die *in vivo*-Funktion der Gene zu beschreiben, wofür Techniken etabliert werden müssen, die eine schnelle und effiziente Überexpression oder Hemmung der Kandidatengene ermöglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das bereits in den 1980er Jahren entwickelte retrovirale Vektorsystem RCAS auf seine Anwendbarkeit für funktionell-genomische *in vivo*-Studien beim Huhn zu überprüfen. Dieses Vektorsystem basiert auf einem replikationskompetenten Rous Sarkoma-Virus und zeichnet sich durch eine hohe Effizienz aus. Die RCAS-Technologie wurde bereits für zellbiologische und embryologische Fragestellungen beim Huhn eingesetzt. Untersuchungen zu seiner Anwendung bei Tieren nach dem Schlupf gibt es dagegen bisher praktisch nicht. Für Fragen zur Funktion und Regulation des Immunsystems ist aber gerade dies von besonderer Relevanz, da das Immunsystem zum Zeitpunkt des Schlupfes noch in weiten Bereichen unreif ist.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein „*green fluorescent protein*“ (GFP) exprimierender RCAS-Vektor konstruiert. An Hand von durchflusszytometrischen Messungen RCAS(BP)A-GFP-transduzierter Hühnerembryofibroblasten konnte ein Einfluss der verwendeten Hühnerlinie auf die Infizierbarkeit mit RCAS(BP)A Vektoren festgestellt werden. Als Grund hierfür kann das Vorkommen von endogenen Retroviren gesehen werden welches zu einer Rezeptor-Interferenz führt. Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass Hühner der retrovirusfreien Linie „0“ homogenere Plasmaspiegel an RCAS-basiertem Protein aufwiesen als Tiere einer kommerziellen Hühnerlinie. GFP-Expression fand sich dabei vorwiegend in Gefäßendothelien, was die RCAS-Technologie insbesondere für die funktionelle Untersuchung von löslichen Proteinen (z. B. Zytokine) als geeignet erscheinen lässt. Darüber hinaus war

virales Protein auch in Zellen der Bursa fabricii und in Herzmuskelzellen nachweisbar.

Zur weiteren Charakterisierung des Systems wurden RCAS-Vektoren verwendet, die das B-Zell-Zytokin chBAFF oder ein lösliches Rezeptorkonstrukt (huBCMA-Fc) zur Neutralisation von chBAFF exprimieren. Biologisch aktives Zytokin konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwei Monaten im Plasma nachgewiesen werden. RCAS(BP)A-chBAFF-Flag-transduzierte Tiere wiesen signifikant höhere B-Zellfrequenzen in der Milz und höhere Antikörperspiegel im Plasma auf, als die Kontrolltiere. Dagegen zeigten Tiere, die den löslichen Rezeptor huBCMA-Fc exprimierten eine signifikante Reduktion der B-Zellzahlen in der Milz und eine hochgradige Hemmung der Entwicklung der B-Zellfollikel in der Bursa fabricii. Dies entspricht den durch Applikation von rekombinantem Protein gewonnenen Daten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Erfahrungen mit der RCAS-Technologie genutzt, um die Funktion eines weiteren Zytokinsystems, des CD40/CD40L-Systems zu untersuchen. Hierzu wurde ein lösliches chCD40-huFc-Fusionsprotein konstruiert, welches als Inhibitor des chCD40L zu einer funktionellen Hemmung des CD40/CD40L-Systems führen sollte. In einem ersten Schritt konnte *in vitro* gezeigt werden, dass chCD40-huFc an ein rekombinantes chCD40L-Protein bindet. *In vivo* führte die RCAS(BP)A-basierte chCD40-huFc-Expression zu einer Reduktion der B-Zell-Frequenz im Blut und des Gewichts der Bursa fabricii. Möglicherweise führt die funktionelle Inhibition des Systems zu einer Reduktion der Zellzahlen, die aus der Medulla der Bursafollikel in die Peripherie auswandern. Anders als bei Menschen mit Defekten im CD40L-Gen konnte bei Hühnern kein erhöhter IgM-Plasmaspiegel festgestellt werden. Jedoch waren die Plasmaspiegel an IgG und IgA erniedrigt, was bei Menschen und Mäusen mit CD40L-Defekten ebenfalls beobachtet wurde.

Die RCAS-Technologie hat sich damit in zwei Modellsystemen als hervorragendes System zur Analyse von Zytokinfunktionen beim Huhn erwiesen. Neben der Untersuchung von Zytokinfunktionen erscheint das System aber auch für die funktionelle Analyse von Wachstumsfaktoren und Hormonen als geeignet.

8 Summary

Introduction of the RCAS retroviral gene transfer technology for functional genomic studies in the chicken

The recently sequenced chicken genome now allows the identification of so far unknown genes. Some of them may play a potential role in the regulation of the immune system. In future studies roles of these genes have to be analyzed. At this *in vitro* studies will be used firstly. But *in vivo* functions of those genes will have to be described in the end. Therefore techniques for a fast and efficient over expression and knock down of candidate genes have to be established.

Goal of this work was to prove the applicability of the RCAS retroviral vector system, which has been developed in the 1980s. This highly efficient system is based on a replication competent Rous Sarkoma-Virus and has already been used in cell and developmental biology studies in the chicken. However studies on its application after hatch haven't been performed so far, despite its particular relevance for studies on the chicken immune system as it is widely immature at the time of hatch.

In the first part of this work, a green fluorescent protein (GFP) expressing vector was constructed. An influence of the chicken line on the susceptibility of chicken embryo fibroblasts was detected in flow cytometric analyses. A possible reason could be the presence of endogenous retroviruses in less susceptible chicken lines leading to receptor interference. In accordance with this observation in *in vivo* tests retrovirus free chickens showed more homogenous plasma titers of RCAS based protein than a commercial chicken line. As GFP expression was predominantly seen in endothelial cells, the RCAS technology can be considered as particularly eligible for the expression of soluble proteins. Additionally viral protein was demonstrated to be expressed in bursal cells and heart muscle.

For further characterization of the RCAS system vectors for the expression of the cytokine chBAFF or a soluble chBAFF receptor construct (huBCMA-Fc) were used. Plasma expression of biologically active cytokine was detectable throughout the entire experiment (two months). RCAS(BP)A-chBAFF-Flag transduced birds showed in comparison to controls significantly increased B cell frequencies in the

spleen as well as enhanced plasma antibody titers. On the other hand animals expressing the soluble receptor huBCMA-Fc showed a significant reduction of splenic B cell frequency and an inhibited development of the bursa of fabricius. These findings correspond to the data obtained in studies with recombinant proteins.

In the second part of this work the experiences with the RCAS technology were used to evaluate the function of the CD40/CD40L system as a second cytokine system. A soluble chCD40-huFc fusion protein was constructed as a functional inhibitor for CD40/CD40L interaction. *In vitro* tests showed that chCD40-huFc was able to bind a soluble chCD40L fusion protein. *In vivo* the RCAS based expression of chCD40-huFc caused a reduction of the blood B cell frequency and the bursa weight. Possibly the functional inhibition of the CD40/CD40L system decreases the number of B cells emigrating from the bursal medulla. Unlike in humans with a defect in the CD40L gene in chickens expressing chCD40-huFc the plasma IgM titer was not increased. However plasma titers of IgA and IgG were decreased, comparably with humans and mice with CD40L defects.

The RCAS gene transfer technology was proved in two different model systems as an excellent system for analyses of cytokine functions in the chicken. Furthermore this system could also be used for functional analyses of growth factors and hormones.

9 Literaturverzeichnis

1. International_Chicken_Genom_Sequencing_ and Consortium, *Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 695-716.
2. McGrew, M.J., et al., *Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors*. EMBO Rep, 2004. **5**(7): p. 728-33.
3. van de Lavoie, M.C., et al., *Germline transmission of genetically modified primordial germ cells*. Nature, 2006. **441**(7094): p. 766-9.
4. Woychik, R.P., et al., *Functional genomics in the post-genome era*. Mutat Res, 1998. **400**(1-2): p. 3-14.
5. Bliss, T.W., et al., *Gene expression profiling of avian macrophage activation*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **105**(3-4): p. 289-99.
6. Munir, S. and V. Kapur, *Transcriptional analysis of the response of poultry species to respiratory pathogens*. Poult Sci, 2003. **82**(6): p. 885-92.
7. Neiman, P.E., et al., *Analysis of gene expression, copy number and palindrome formation with a Dt40 enriched cDNA microarray*. Subcell Biochem, 2006. **40**: p. 245-56.
8. Neiman, P.E., et al., *Analysis of gene expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6378-83.
9. Burgess, S.C., *Proteomics in the chicken: tools for understanding immune responses to avian diseases*. Poult Sci, 2004. **83**(4): p. 552-73.
10. McCarthy, F.M., et al., *Modeling a whole organ using proteomics: the avian bursa of Fabricius*. Proteomics, 2006. **6**(9): p. 2759-71.
11. Scott, T.R., et al., *Hematopoietic prostaglandin D2 synthase in the chicken Harderian gland*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **108**(3-4): p. 295-306.
12. Kothlow, S., et al., *Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken*. Int Immunol, 2007. **19**(2): p. 203-15.
13. Schneider, K., et al., *Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival*. Int Immunol, 2004. **16**(1): p. 139-48.
14. Schneider, K., et al., *cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(10): p. 879-83.
15. Houdebine, L.M.Y., C.; Wagman, G., *Animal Transgenesis and Cloning*. 1 ed. 2003: Wiley & Sons.

16. Ellermann, V.B.O., *Experimentelle Leukämie bei Hühnern*. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig., 1908. **46**: p. 595-609.
17. Rous, P., *A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from tumor cells*. J. Exp. Med. , 1910. **13**: p. 397-411.
18. Maeda, N., H. Fan, and Y. Yoshikai, *Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms*. Rev Med Virol, 2008. **18**(6): p. 387-405.
19. Osswald, H., *[Nobel prize for medicine and physiology 1966]*. Med Klin, 1967. **62**(2): p. 70-1.
20. Crawford, L.V. and E.M. Crawford, *The properties of Rous sarcoma virus purified by density gradient centrifugation*. Virology, 1961. **13**: p. 227-32.
21. Baltimore, D., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1209-11.
22. Temin, H.M. and S. Mizutani, *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1211-3.
23. Temin, H.M., *Nature of the provirus of Rous sarcoma*. Natl. Cancer Inst. Monogr. , 1964. **17**: p. 557-570.
24. Coffin, J.M.H., S.H.; Varmus, H.E., *Retroviruses*. 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
25. Weiss, R.A., *The discovery of endogenous retroviruses*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 67.
26. Hanafusa, H., T. Hanafusa, and H. Rubin, *The defectiveness of Rous sarcoma virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1963. **49**: p. 572-80.
27. Vogt, P.K., *A virus released by "nonproducing" Rous sarcoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(3): p. 801-8.
28. Weiss, R., *Spontaneous virus production from "non-virus producing" Rous sarcoma cells*. Virology, 1967. **32**(4): p. 719-23.
29. Hanafusa, H., T. Miyamoto, and T. Hanafusa, *A cell-associated factor essential for formation of an infectious form of Rous sarcoma virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **66**(2): p. 314-21.
30. Baluda, M.A., *Widespread presence, in chickens, of DNA complementary to the RNA genome of avian leukosis viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(3): p. 576-80.
31. Rosenthal, P.N., et al., *DNA in uninfected and virus-infected cells complementary to avian tumor virus RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(10): p. 2336-40.
32. Varmus, H.E., et al., *Detection of avian tumor virus-specific nucleotide*

- sequences in avian cell DNAs (reassociation kinetics-RNA tumor viruses-gas antigen-Rous sarcoma virus, chick cells). Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. 69(1): p. 20-4.*
33. McNally, M.T., *RNA processing control in avian retroviruses*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 3869-83.
 34. Payne, L.N., *Retrovirus-induced disease in poultry*. Poult Sci, 1998. **77**(8): p. 1204-12.
 35. Nemeth, S.P., et al., *Deletions within the amino-terminal half of the c-src gene product that alter the functional activity of the protein*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(3): p. 1109-19.
 36. Mellon, P. and P.H. Duesberg, *Subgenomic, cellular Rous sarcoma virus RNAs contain oligonucleotides from the 3' half and the 5' terminus of virion RNA*. Nature, 1977. **270**(5638): p. 631-4.
 37. Payne, L.N., et al., *A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 4): p. 801-7.
 38. Hughes, S.H., *The RCAS vector system*. Folia Biol (Praha), 2004. **50**(3-4): p. 107-19.
 39. Stanley, K.K., *The molecular mechanism of complement C9 insertion and polymerisation in biological membranes*. Curr Top Microbiol Immunol, 1989. **140**: p. 49-65.
 40. Robinson, H.L., *Inheritance and expression of chicken genes that are related to avian leukosis sarcoma virus genes*. Curr Top Microbiol Immunol, 1978. **83**: p. 1-36.
 41. Crittenden, L.B. and D.W. Salter, *A transgene, alv6, that expresses the envelope of subgroup A avian leukosis virus reduces the rate of congenital transmission of a field strain of avian leukosis virus*. Poult Sci, 1992. **71**(5): p. 799-806.
 42. Salter, D.W., et al., *Response of chickens carrying germline insert ALVA11 to challenge with a field strain of subgroup A avian leukosis virus*. Avian Dis, 1998. **42**(4): p. 781-6.
 43. Earp, L.J., et al., *The avian retrovirus avian sarcoma/leukosis virus subtype A reaches the lipid mixing stage of fusion at neutral pH*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3058-66.
 44. Barnard, R.J., et al., *Low pH is required for avian sarcoma and leukosis virus Env-dependent viral penetration into the cytosol and not for viral uncoating*. J Virol, 2004. **78**(19): p. 10433-41.
 45. Czernilofsky, A.P., et al., *The nucleotide sequence of an untranslated but conserved domain at the 3' end of the avian sarcoma virus genome*.

- Nucleic Acids Res, 1980. **8**(13): p. 2967-84.
46. Czernilofsky, A.P., et al., *Corrections to the nucleotide sequence of the src gene of Rous sarcoma virus*. Nature, 1983. **301**(5902): p. 736-8.
 47. Czernilofsky, A.P., et al., *Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product*. Nature, 1980. **287**(5779): p. 198-203.
 48. Sorge, J. and S.H. Hughes, *Polypurine tract adjacent to the U3 region of the Rous sarcoma virus genome provides a cis-acting function*. J Virol, 1982. **43**(2): p. 482-8.
 49. Sorge, J., W. Ricci, and S.H. Hughes, *cis-Acting RNA packaging locus in the 115-nucleotide direct repeat of Rous sarcoma virus*. J Virol, 1983. **48**(3): p. 667-75.
 50. Hughes, S. and E. Kosik, *Mutagenesis of the region between env and src of the SR-A strain of Rous sarcoma virus for the purpose of constructing helper-independent vectors*. Virology, 1984. **136**(1): p. 89-99.
 51. Strayer, D.S., *Gene therapy using SV40-derived vectors: what does the future hold?* J Cell Physiol, 1999. **181**(3): p. 375-84.
 52. Petropoulos, C.J. and S.H. Hughes, *Replication-competent retrovirus vectors for the transfer and expression of gene cassettes in avian cells*. J Virol, 1991. **65**(7): p. 3728-37.
 53. Greenhouse, J.J., et al., *Helper-independent retrovirus vectors with Rous-associated virus type O long terminal repeats*. J Virol, 1988. **62**(12): p. 4809-12.
 54. Hughes, S.H., et al., *Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors*. J Virol, 1987. **61**(10): p. 3004-12.
 55. Hughes, S., et al., *Mutation of a termination codon affects src initiation*. Mol Cell Biol, 1984. **4**(9): p. 1738-46.
 56. Fekete, D.M. and C.L. Cepko, *Retroviral infection coupled with tissue transplantation limits gene transfer in the chicken embryo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2350-4.
 57. Petropoulos, C.J., et al., *Appropriate in vivo expression of a muscle-specific promoter by using avian retroviral vectors for gene transfer [corrected]*. J Virol, 1992. **66**(6): p. 3391-7.
 58. Petropoulos, C.J., et al., *The chicken skeletal muscle alpha-actin promoter is tissue specific in transgenic mice*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(9): p. 3785-92.
 59. Sayegh, C.E., M.A. Rao, and M.J. Ratcliffe, *Avian B cell development:*

- lessons from transgenic models*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **72**(1-2): p. 31-7.
60. Loftus, S.K., et al., *Generation of RCAS vectors useful for functional genomic analyses*. DNA Res, 2001. **8**(5): p. 221-6.
61. Hartley, J.L., G.F. Temple, and M.A. Brasch, *DNA cloning using in vitro site-specific recombination*. Genome Res, 2000. **10**(11): p. 1788-95.
62. Walhout, A.J., et al., *GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes*. Methods Enzymol, 2000. **328**: p. 575-92.
63. Astrin, S.M., E.G. Buss, and W.S. Haywards, *Endogenous viral genes are non-essential in the chicken*. Nature, 1979. **282**(5736): p. 339-41.
64. Himly, M., et al., *The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses*. Virology, 1998. **248**(2): p. 295-304.
65. Fritsch, E.F. and H.M. Temin, *Inhibition of viral DNA synthesis in stationary chicken embryo fibroblasts infected with avian retroviruses*. J Virol, 1977. **24**(2): p. 461-9.
66. Miller, D.G., M.A. Adam, and A.D. Miller, *Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(8): p. 4239-42.
67. Hatzioannou, T. and S.P. Goff, *Infection of nondividing cells by Rous sarcoma virus*. J Virol, 2001. **75**(19): p. 9526-31.
68. Katz, R.A., et al., *Transduction of interphase cells by avian sarcoma virus*. J Virol, 2002. **76**(11): p. 5422-34.
69. Potts, W.M., et al., *Epitope mapping of monoclonal antibodies to gag protein p19 of avian sarcoma and leukaemia viruses*. J Gen Virol, 1987. **68** (Pt 12): p. 3177-82.
70. Hartl, M. and K. Bister, *Specific activation in jun-transformed avian fibroblasts of a gene (bkj) related to the avian beta-keratin gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11731-5.
71. Hartl, M., P.K. Vogt, and K. Bister, *A quail long-term cell culture transformed by a chimeric jun oncogene*. Virology, 1995. **207**(1): p. 321-6.
72. Hadman, M., M. Loo, and T.J. Bos, *In vivo viral and cellular Jun complexes exhibit differential interaction with a number of in vitro generated 'AP-1- and CREB-like' target sequences*. Oncogene, 1993. **8**(7): p. 1895-903.
73. Givol, I., et al., *Bcl-2 expressed using a retroviral vector is localized*

- primarily in the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum of chicken embryo fibroblasts. Cell Growth Differ*, 1994. **5**(4): p. 419-29.
74. Garber, E.A., et al., *Avian cells expressing the murine Mx1 protein are resistant to influenza virus infection. Virology*, 1991. **180**(2): p. 754-62.
75. Benfield, C.T., et al., *Asparagine 631 variants of the chicken Mx protein do not inhibit influenza virus replication in primary chicken embryo fibroblasts or in vitro surrogate assays. J Virol*, 2008. **82**(15): p. 7533-9.
76. Fields-Berry, S.C., A.L. Halliday, and C.L. Cepko, *A recombinant retrovirus encoding alkaline phosphatase confirms clonal boundary assignment in lineage analysis of murine retina. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(2): p. 693-7.
77. Fekete, D.M. and C.L. Cepko, *Replication-competent retroviral vectors encoding alkaline phosphatase reveal spatial restriction of viral gene expression/transduction in the chick embryo. Mol Cell Biol*, 1993. **13**(4): p. 2604-13.
78. Hamburger, V.H., H.L., *A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morph*, 1951. **88**: p. 49-92.
79. Ingham, P.W., *Segment polarity genes and cell patterning within the Drosophila body segment. Curr Opin Genet Dev*, 1991. **1**(2): p. 261-7.
80. Riddle, R.D., et al., *Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. Cell*, 1993. **75**(7): p. 1401-16.
81. Sayegh, C.E., et al., *Development of B cells expressing surface immunoglobulin molecules that lack V(D)J-encoded determinants in the avian embryo bursa of fabricius. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(19): p. 10806-11.
82. Sayegh, C.E., G. Drury, and M.J. Ratcliffe, *Efficient antibody diversification by gene conversion in vivo in the absence of selection for V(D)J-encoded determinants. EMBO J*, 1999. **18**(22): p. 6319-28.
83. Sayegh, C.E. and M.J. Ratcliffe, *Perinatal deletion of B cells expressing surface Ig molecules that lack V(D)J-encoded determinants in the bursa of Fabricius is not due to intrafollicular competition. J Immunol*, 2000. **164**(10): p. 5041-8.
84. Pike, K.A., et al., *The cytoplasmic domain of Ig alpha is necessary and sufficient to support efficient early B cell development. J Immunol*, 2004. **172**(4): p. 2210-8.
85. Aliahmad, P., K.A. Pike, and M.J. Ratcliffe, *Cell surface immunoglobulin regulated checkpoints in chicken B cell development. Vet Immunol Immunopathol*, 2005. **108**(1-2): p. 3-9.

86. Harpavat, S. and C.L. Cepko, *RCAS-RNAi: a loss-of-function method for the developing chick retina*. BMC Dev Biol, 2006. **6**: p. 2.
87. Bromberg-White, J.L., et al., *Delivery of short hairpin RNA sequences by using a replication-competent avian retroviral vector*. J Virol, 2004. **78**(9): p. 4914-6.
88. Stewart, S.A., et al., *Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells*. RNA, 2003. **9**(4): p. 493-501.
89. Suksaweang, S., et al., *Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation*. Dev Biol, 2004. **266**(1): p. 109-22.
90. Orsulic, S., *An RCAS-TVA-based approach to designer mouse models*. Mamm Genome, 2002. **13**(10): p. 543-7.
91. Barsov, E.V., W.S. Payne, and S.H. Hughes, *Adaptation of chimeric retroviruses in vitro and in vivo: isolation of avian retroviral vectors with extended host range*. J Virol, 2001. **75**(11): p. 4973-83.
92. Stuhlmann, H., R. Jaenisch, and R.C. Mulligan, *Construction and properties of replication-competent murine retroviral vectors encoding methotrexate resistance*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(1): p. 100-8.
93. Young, J.A., P. Bates, and H.E. Varmus, *Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 1811-6.
94. Bates, P., J.A. Young, and H.E. Varmus, *A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor*. Cell, 1993. **74**(6): p. 1043-51.
95. Federspiel, M.J., et al., *A system for tissue-specific gene targeting: transgenic mice susceptible to subgroup A avian leukosis virus-based retroviral vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11241-5.
96. Holland, E.C. and H.E. Varmus, *Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1218-23.
97. Holland, E.C., et al., *A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice*. Genes Dev, 1998. **12**(23): p. 3675-85.
98. Lewis, B.C., D.S. Klimstra, and H.E. Varmus, *The c-myc and PyMT oncogenes induce different tumor types in a somatic mouse model for pancreatic cancer*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3127-38.
99. Du, Z. and Y. Li, *RCAS-TVA in the mammary gland: an in vivo oncogene screen and a high fidelity model for breast transformation?* Cell Cycle,

2007. **6**(7): p. 823-6.
100. Du, Z., et al., *Introduction of oncogenes into mammary glands in vivo with an avian retroviral vector initiates and promotes carcinogenesis in mouse models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17396-401.
101. Seidler, B., et al., *A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown in vivo by using avian retroviral vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10137-42.
102. Waters, T.D., et al., *Yellow fever vaccination, avian leukosis virus, and cancer risk in man*. Science, 1972. **177**(43): p. 76-7.
103. Rolle, M.M., Anton, *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Vol. 8. 2006: Enke.
104. Bundesamt_für_Verbraucherschutz_und_Lebensmittelsicherheit. *Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von C-Typ Retroviren der Hühner gemäß Gentechniksicherheitsverordnung*. 1994 27.07.2005 [cited 2009 03 27]; Available from: http://www.bvl.bund.de/cln_027/nn_520782/DE/06_Gentechnik/093_Z_KBS/01_Allg_Stellungnahmen/09_viren/risk_ctyp_retro.html.
105. Jaenisch, R., *Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(4): p. 1260-4.
106. Jaenisch, R., *Infection of mouse blastocysts with SV40 DNA: normal development of the infected embryos and persistence of SV40-specific DNA sequences in the adult animals*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1975. **39 Pt 1**: p. 375-80.
107. Gordon, J.W. and F.H. Ruddle, *Germ line transmission in transgenic mice*. Prog Clin Biol Res, 1982. **85 Pt B**: p. 111-24.
108. Hammer, R.E., et al., *Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection*. Nature, 1985. **315**(6021): p. 680-3.
109. Romanoff, A.L., *The avian embryo*. 1960, New York: Macmillan. 1305.
110. Kochav, S., M. Ginsburg, and H. Eyal-Giladi, *From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. II. Microscopic anatomy and cell population dynamics*. Dev Biol, 1980. **79**(2): p. 296-308.
111. Mozdziak, P.E. and J.N. Petitte, *Status of transgenic chicken models for developmental biology*. Dev Dyn, 2004. **229**(3): p. 414-21.
112. Salter, D.W., et al., *Gene insertion into the chicken germ line by retroviruses*. Poult Sci, 1986. **65**(8): p. 1445-58.

113. Bosselman, R.A., et al., *Germline transmission of exogenous genes in the chicken*. Science, 1989. **243**(4890): p. 533-5.
114. Bosselman, R.A., et al., *Replication-defective vectors of reticuloendotheliosis virus transduce exogenous genes into somatic stem cells of the unincubated chicken embryo*. J Virol, 1989. **63**(6): p. 2680-9.
115. Harvey, A.J., et al., *Consistent production of transgenic chickens using replication-deficient retroviral vectors and high-throughput screening procedures*. Poult Sci, 2002. **81**(2): p. 202-12.
116. Cosset, F.L., et al., *A new avian leukosis virus-based packaging cell line that uses two separate transcomplementing helper genomes*. J Virol, 1990. **64**(3): p. 1070-8.
117. Rapp, J.C., et al., *Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens*. Transgenic Res, 2003. **12**(5): p. 569-75.
118. Lund, A.H., M. Duch, and F.S. Pedersen, *Transcriptional Silencing of Retroviral Vectors*. J Biomed Sci, 1996. **3**(6): p. 365-378.
119. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
120. Pfeifer, A., et al., *Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2140-5.
121. Corcoran, J., et al., *Retinoic acid receptor beta2 and neurite outgrowth in the adult mouse spinal cord in vitro*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 19): p. 3779-86.
122. Chapman, S.C., et al., *Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector*. Development, 2005. **132**(5): p. 935-40.
123. Scott, B.B. and C. Lois, *Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(45): p. 16443-7.
124. Rudolph, N.S., *Biopharmaceutical production in transgenic livestock*. Trends Biotechnol, 1999. **17**(9): p. 367-74.
125. Lillico, S.G., et al., *Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(6): p. 1771-6.
126. Lillico, S.G., et al., *Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs*. Drug Discov Today, 2005. **10**(3): p. 191-6.
127. Dimmock, N.J.E.A.J.L.K.N., ed. *Introduction to modern Virology*. 2007, Blackwell Publishers.

128. Sheppard, M., et al., *Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease*. Arch Virol, 1998. **143**(5): p. 915-30.
129. Johnson, M.A., C. Pooley, and J.W. Lowenthal, *Delivery of avian cytokines by adenovirus vectors*. Dev Comp Immunol, 2000. **24**(2-3): p. 343-54.
130. Gao, W., et al., *Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization*. J Virol, 2006. **80**(4): p. 1959-64.
131. Toro, H., et al., *Protective avian influenza in ovo vaccination with non-replicating human adenovirus vector*. Vaccine, 2007. **25**(15): p. 2886-91.
132. Toro, H., et al., *Protection of chickens against avian influenza with non-replicating adenovirus-vectored vaccine*. Vaccine, 2008. **26**(21): p. 2640-6.
133. Murphy, D., *Production of transgenic rodents by the microinjection of cloned DNA into fertilized one-celled eggs*. Methods Mol Biol, 2008. **461**: p. 71-109.
134. Love, J., et al., *Transgenic birds by DNA microinjection*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(1): p. 60-3.
135. Sherman, A., et al., *Transposition of the Drosophila element mariner into the chicken germ line*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(11): p. 1050-3.
136. Etches, R.J., *The hard cell(s) of avian transgenesis*. Transgenic Res, 2006. **15**(5): p. 521-6.
137. Robertson, E., et al., *Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector*. Nature, 1986. **323**(6087): p. 445-8.
138. Capecchi, M.R., *Altering the genome by homologous recombination*. Science, 1989. **244**(4910): p. 1288-92.
139. Mueller, S., et al., *Chimeric pigs following blastocyst injection of transgenic porcine primordial germ cells*. Mol Reprod Dev, 1999. **54**(3): p. 244-54.
140. Cibelli, J.B., et al., *Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(7): p. 642-6.
141. Petite, J.N., et al., *Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells*. Development, 1990. **108**(1): p. 185-9.
142. Thoraval, P., et al., *Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white Leghorns by transfer of early blastodermal cells*. Poult Sci, 1994. **73**(12): p. 1897-905.

143. Carsience, R.S., et al., *Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos*. Development, 1993. **117**(2): p. 669-75.
144. Watanabe, M., et al., *Distribution analysis of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras*. Development, 1992. **114**(2): p. 331-8.
145. Pain, B., et al., *Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities*. Development, 1996. **122**(8): p. 2339-48.
146. Etches, R.J., et al., *Contributions to somatic and germline lineages of chicken blastodermal cells maintained in culture*. Mol Reprod Dev, 1996. **45**(3): p. 291-8.
147. van de Lavoie, M.C., et al., *High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells*. Mech Dev, 2006. **123**(1): p. 31-41.
148. Kuwana, T., *Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage*. Development, Growth and Differentiation, 1993. **35**: p. 237-243.
149. Petitte, J.N., L. Karagenc, and M. Ginsburg, *The origin of the avian germ line and transgenesis in birds*. Poult Sci, 1997. **76**(8): p. 1084-92.
150. Yasuda, Y., et al., *A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells*. J Reprod Fertil, 1992. **96**(2): p. 521-8.
151. Naito, M., et al., *Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells*. Mol Reprod Dev, 1994. **39**(2): p. 153-61.
152. Leighton, P.A., et al., *Genetic modification of primordial germ cells by gene trapping, gene targeting, and phiC31 integrase*. Mol Reprod Dev, 2008. **75**(7): p. 1163-75.
153. Kenneth, M., *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. 2008, New York: Garland Science. 887.
154. Butler, J.E., et al., *Antibody repertoire development in swine*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 199-221.
155. Yasuda, M., et al., *The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development*. Vet Res, 2006. **37**(3): p. 401-15.
156. Hanson, N.B. and D.K. Lanning, *Microbial induction of B and T cell areas in rabbit appendix*. Dev Comp Immunol, 2008. **32**(8): p. 980-91.
157. Mage, R.G., D. Lanning, and K.L. Knight, *B cell and antibody repertoire development in rabbits: the requirement of gut-associated lymphoid tissues*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 137-53.
158. Ratcliffe, M.J. and K.A. Jacobsen, *Rearrangement of immunoglobulin*

- genes in chicken B cell development*. Semin Immunol, 1994. **6**(3): p. 175-84.
159. Houssaint, E., A. Torano, and J. Ivanyi, *Ontogenic restriction of colonization of the bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1983. **13**(7): p. 590-5.
160. Reynaud, C.A., et al., *Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo*. EMBO J, 1992. **11**(12): p. 4349-58.
161. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
162. Pink, J.R., O. Vainio, and A.M. Rijnbeek, *Clones of B lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1985. **15**(1): p. 83-7.
163. Lassila, O., *Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1989. **19**(5): p. 955-8.
164. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Survivors of bursal B cell production and emigration*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 991-7.
165. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *B cell emigration directly from the cortex of lymphoid follicles in the bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1994. **24**(2): p. 458-63.
166. Yasuda, M., et al., *Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(2): p. 159-66.
167. Arakawa, H., et al., *Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers*. EMBO J, 1996. **15**(10): p. 2540-6.
168. Arakawa, H., et al., *Oligoclonal development of B cells bearing discrete Ig chains in chicken single germinal centers*. J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4232-41.
169. Mackay, F. and J.L. Browning, *BAFF: a fundamental survival factor for B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 465-75.
170. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 231-64.
171. Schneider, P., *The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 282-9.
172. Koskela, K., et al., *Chicken B-cell-activating factor: regulator of B-cell survival in the bursa of fabricius*. Scand J Immunol, 2004. **59**(5): p. 449-57.
173. Gordon, J., *CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte survival*,

- growth, and differentiation. *Blood Rev*, 1995. **9**(1): p. 53-6.
174. Kothlow, S., et al., *CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture*. *Dev Comp Immunol*, 2008. **32**(9): p. 1015-26.
175. Tregaskes, C.A., et al., *Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate*. *Dev Comp Immunol*, 2005. **29**(4): p. 361-74.
176. Schneider, P., et al., *BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth*. *J Exp Med*, 1999. **189**(11): p. 1747-56.
177. Mukhopadhyay, A., et al., *Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 15978-81.
178. Moore, P.A., et al., *BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator*. *Science*, 1999. **285**(5425): p. 260-3.
179. Shu, H.B., W.H. Hu, and H. Johnson, *TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(5): p. 680-3.
180. Gross, J.A., et al., *TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease*. *Nature*, 2000. **404**(6781): p. 995-9.
181. Guan, Z.B., et al., *Cloning, expression and bioactivity of duck BAFF*. *Mol Immunol*, 2007. **44**(6): p. 1471-6.
182. Dan, W.B., et al., *Molecular cloning, in vitro expression and bioactivity of goose B-cell activating factor*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2007. **118**(1-2): p. 113-20.
183. Guan, Z.B., et al., *cDNA cloning, expression and bioactivity of porcine BAFF*. *Dev Comp Immunol*, 2007. **31**(12): p. 1211-9.
184. Guan, Z.B., Y. Shui, and S.Q. Zhang, *Two related ligands of the TNF family, BAFF and APRIL, in rabbit: molecular cloning, 3D modeling, and tissue distribution*. *Cytokine*, 2007. **39**(3): p. 192-200.
185. Yang, J., R. Pospisil, and R.G. Mage, *Expression and localization of rabbit B-cell activating factor (BAFF) and its specific receptor BR3 in cells and tissues of the rabbit immune system*. *Dev Comp Immunol*, 2009. **33**(5): p. 697-708.
186. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(9): p. 3666-70.

187. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
188. Karpusas, M., et al., *Crystal structure of extracellular human BAFF, a TNF family member that stimulates B lymphocytes*. J Mol Biol, 2002. **315**(5): p. 1145-54.
189. Nardelli, B., et al., *Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells*. Blood, 2001. **97**(1): p. 198-204.
190. von Bulow, G.U. and R.J. Bram, *NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily*. Science, 1997. **278**(5335): p. 138-41.
191. Thompson, J.S., et al., *BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2108-11.
192. Yan, M., et al., *Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1547-52.
193. Ng, L.G., et al., *B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 807-17.
194. Bossen, C. and P. Schneider, *BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling*. Semin Immunol, 2006. **18**(5): p. 263-75.
195. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2111-4.
196. Shulga-Morskaya, S., et al., *B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2331-41.
197. Avery, D.T., et al., *BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(2): p. 286-97.
198. O'Connor, B.P., et al., *BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells*. J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 91-8.
199. Rahman, Z.S., et al., *Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice*. J Exp Med, 2003. **198**(8): p. 1157-69.
200. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 822-9.

201. Castigli, E., et al., *TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 35-9.
202. Batten, M., et al., *BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1453-66.
203. Khare, S.D., et al., *Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3370-5.
204. Mackay, F., et al., *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1697-710.
205. Zhang, J., et al., *Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 6-10.
206. Groom, J., et al., *Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 59-68.
207. Cheema, G.S., et al., *Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p. 1313-9.
208. Gorelik, L., et al., *Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 937-45.
209. Lesley, R., et al., *Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 441-53.
210. Craxton, A., et al., *Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4464-71.
211. Scapini, P., et al., *Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases*. Blood, 2005. **105**(2): p. 830-7.
212. Chu, V.T., et al., *In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 5947-57.
213. Reddy, S.K., et al., *The BAFF-Interacting receptors of chickens*. Dev Comp Immunol, 2008. **32**(9): p. 1076-87.
214. Kothlow, S., *Charakterisierung des Zytokins BAFF als wichtiger Regulator der B-Zellfunktion beim Haushuhn*, in *Institute for Animalphysiology*. 2004, Ludwig-Maximilians-Universität: Munich. p. 143.

215. Noelle, R.J., et al., *A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6550-4.
216. Graf, D., et al., *Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells*. Eur J Immunol, 1992. **22**(12): p. 3191-4.
217. Hollenbaugh, D., et al., *The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity*. EMBO J, 1992. **11**(12): p. 4313-21.
218. Armitage, R.J., et al., *Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40*. Nature, 1992. **357**(6373): p. 80-2.
219. Allen, R.C., et al., *CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome*. Science, 1993. **259**(5097): p. 990-3.
220. Aruffo, A., et al., *The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome*. Cell, 1993. **72**(2): p. 291-300.
221. Mazzei, G.J., et al., *Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7025-8.
222. Naismith, J.H. and S.R. Sprang, *Modularity in the TNF-receptor family*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(2): p. 74-9.
223. Singh, J., et al., *The role of polar interactions in the molecular recognition of CD40L with its receptor CD40*. Protein Sci, 1998. **7**(5): p. 1124-35.
224. Grassme, H., et al., *Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 30289-99.
225. Grassme, H., et al., *Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 298-307.
226. Roy, M., et al., *The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells*. J Immunol, 1993. **151**(5): p. 2497-510.
227. Van den Eertwegh, A.J., et al., *In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of CD40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate T-B cell interactions*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1555-65.
228. Gauchat, J.F., et al., *Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils*. Nature, 1993. **365**(6444): p. 340-3.
229. Gauchat, J.F., et al., *CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils*. Eur J Immunol, 1995. **25**(3): p. 863-5.

230. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
231. Grammer, A.C., et al., *The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 4996-5010.
232. Castle, B.E., et al., *Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes*. J Immunol, 1993. **151**(4): p. 1777-88.
233. Casamayor-Palleja, M., M. Khan, and I.C. MacLennan, *A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1293-301.
234. Uckun, F.M., et al., *Temporal association of CD40 antigen expression with discrete stages of human B-cell ontogeny and the efficacy of anti-CD40 immunotoxins against clonogenic B-lineage acute lymphoblastic leukemia as well as B-lineage non-Hodgkin's lymphoma cells*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2449-56.
235. Vyth-Dreese, F.A., et al., *Localization in situ of the co-stimulatory molecules B7.1, B7.2, CD40 and their ligands in normal human lymphoid tissue*. Eur J Immunol, 1995. **25**(11): p. 3023-9.
236. Caux, C., et al., *Functional CD40 on B lymphocytes and dendritic cells*. Res Immunol, 1994. **145**(3): p. 235-9; discussion 244-9.
237. Alderson, M.R., et al., *CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 669-74.
238. Munroe, M.E. and G.A. Bishop, *A costimulatory function for T cell CD40*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 671-82.
239. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation*. Immunol Rev, 1996. **153**: p. 85-106.
240. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
241. Bereznaya, N.M. and V.F. Chekhun, *Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy*. Exp Oncol, 2007. **29**(1): p. 2-12.
242. Notarangelo, L.D., M. Duse, and A.G. Ugazio, *Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM)*. Immunodeficiency Rev, 1992. **3**(2): p. 101-21.
243. Renshaw, B.R., et al., *Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1889-900.

244. Xu, J., et al., *Mice deficient for the CD40 ligand*. Immunity, 1994. **1**(5): p. 423-31.
245. Shinde, S., et al., *CD40L is important for induction of, but not response to, costimulatory activity. ICAM-1 as the second costimulatory molecule rapidly up-regulated by CD40L*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2764-8.
246. Mayumi, M., et al., *Role of LFA-1/ICAM-1-dependent cell adhesion in CD40-mediated inhibition of anti-IgM antibody-induced B-cell death*. J Allergy Clin Immunol, 1995. **96**(6 Pt 2): p. 1136-44.
247. Clatza, A., et al., *CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6478-87.
248. Urashima, M., et al., *CD40 ligand triggers interleukin-6 mediated B cell differentiation*. Leuk Res, 1996. **20**(6): p. 507-15.
249. Burdin, N., et al., *Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2533-44.
250. Guzman-Rojas, L., et al., *Life and death within germinal centres: a double-edged sword*. Immunology, 2002. **107**(2): p. 167-75.
251. Dedeoglu, F., et al., *Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB*. Int Immunol, 2004. **16**(3): p. 395-404.
252. Xu, Z., et al., *Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination*. Crit Rev Immunol, 2007. **27**(4): p. 367-97.
253. Notarangelo, L.D., et al., *Defects of class-switch recombination*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(4): p. 855-64.
254. Zan, H., et al., *CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu-->S alpha and sequential S mu-->S gamma, S gamma-->S alpha DNA recombination*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5217-25.
255. Zhang, K., E.A. Clark, and A. Saxon, *CD40 stimulation provides an IFN-gamma-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production*. J Immunol, 1991. **146**(6): p. 1836-42.
256. Durandy, A., et al., *Induction by anti-CD40 antibody or soluble CD40 ligand and cytokines of IgG, IgA and IgE production by B cells from patients with X-linked hyper IgM syndrome*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2294-9.

257. Fischer, K.P., et al., *Identification and characterization of functional CD154 (CD40 ligand) in the Pekin duck*. Dev Comp Immunol, 2007. **31**(1): p. 61-71.
258. Fiedler, H., U. Losch, and K. Hala, *Establishment of a B-compatible chicken line with normogammaglobulinaemia and dysgammaglobulinaemia (IgM/IgG)*. Folia Biol (Praha), 1980. **26**(1): p. 17-25.
259. Losch, U., et al., *Course of serum-Ig concentrations in B12 chickens of the UM line*. Immunobiology, 1981. **158**(5): p. 416-25.
260. DuBridge, R.B., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 379-87.
261. Beug, H., et al., *Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation*. Cell, 1979. **18**(2): p. 375-90.
262. Morgenroth, I., *Charakterisierung des CD40-CD40L-Systems als wichtiger Regulator der B-Zellfunktion des Haushuhns*, in *Institute for Animalphysiology*. 2007, Ludwig-Maximilians-Universität: Munich. p. 131.
263. Erhard, M.H., et al., *Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay systems for the detection of chicken immunoglobulins G, M, and A using monoclonal antibodies*. Poult Sci, 1992. **71**(2): p. 302-10.
264. Gräf, Y., *In situ Charakterisierung aviärer myeloider Zellen in Haut, Bursa und Lunge des Haushuhns*. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät, in *Institut for Animalphysiology*. 2006, University of Munich: Munich.
265. Paramithiotis, E., L. Tkalec, and M.J. Ratcliffe, *High levels of CD45 are coordinately expressed with CD4 and CD8 on avian thymocytes*. J Immunol, 1991. **147**(11): p. 3710-7.
266. Chen, C.L., J.E. Lehmeyer, and M.D. Cooper, *Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes*. J Immunol, 1982. **129**(6): p. 2580-5.
267. Rothwell, C.J., L. Vervelde, and T.F. Davison, *Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20*. Vet Immunol Immunopathol, 1996. **55**(1-3): p. 225-34.
268. Chen, C.L., et al., *Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens*. J Exp Med, 1986. **164**(1): p. 375-80.
269. Luhtala, M., et al., *Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species*. Hybridoma, 1993. **12**(6): p. 633-46.

270. Luhtala, M., et al., *Characterization of chicken CD8-specific monoclonal antibodies recognizing novel epitopes*. Scand J Immunol, 1995. **42**(1): p. 171-4.
271. Sowder, J.T., et al., *A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor*. J Exp Med, 1988. **167**(2): p. 315-22.
272. Cihak, J., et al., *Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens*. Eur J Immunol, 1988. **18**(4): p. 533-7.
273. Char, D., et al., *A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor-3-specific antibody*. J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3547-55.
274. Seliger, C., *Entwicklung eines durchflusszytometrischen Verfahrens zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Thrombozytenzahl sowie zur Leukozytendifferenzierung beim Huhn*, in *Institute for Animalphysiology*. 2009, Ludwig-Maximilians-Universität: Munich. p. 202.
275. Veromaa, T., et al., *Monoclonal antibodies against chicken Bu-1a and Bu-1b alloantigens*. Hybridoma, 1988. **7**(1): p. 41-8.
276. Mast, J., et al., *Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **61**(2-4): p. 343-57.
277. Withers, D.R., T.F. Davison, and J.R. Young, *Diversified bursal medullary B cells survive and expand independently after depletion following neonatal infectious bursal disease virus infection*. Immunology, 2006. **117**(4): p. 558-65.
278. Rong, L. and P. Bates, *Analysis of the subgroup A avian sarcoma and leukosis virus receptor: the 40-residue, cysteine-rich, low-density lipoprotein receptor repeat motif of Tva is sufficient to mediate viral entry*. J Virol, 1995. **69**(8): p. 4847-53.
279. Zingler, K. and J.A. Young, *Residue Trp-48 of Tva is critical for viral entry but not for high-affinity binding to the SU glycoprotein of subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7510-6.
280. Contreras-Alcantara, S., J.A. Godby, and S.E. Delos, *The single ligand-binding repeat of Tva, a low density lipoprotein receptor-related protein, contains two ligand-binding surfaces*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22827-38.
281. Wang, Q.Y., et al., *Solution structure of the viral receptor domain of Tva and its implications in viral entry*. J Virol, 2002. **76**(6): p. 2848-56.
282. Tonelli, M., et al., *The solution structure of the viral binding domain of Tva, the cellular receptor for subgroup A avian leukosis and sarcoma*

- virus. FEBS Lett, 2001. **509**(2): p. 161-8.
283. Davison, F.K., B; Schat, KA, *Avian immunology*. 2008, London: Academic Press.
284. Hamal, K.R., et al., *Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens*. Poult Sci, 2006. **85**(8): p. 1364-72.
285. Mast, J. and B.M. Goddeeris, *Development of immunocompetence of broiler chickens*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **70**(3-4): p. 245-56.
286. Rose, M.E. and E. Orlans, *Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick*. Dev Comp Immunol, 1981. **5**(1): p. 15-20.
287. Pannell, D. and J. Ellis, *Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors*. Rev Med Virol, 2001. **11**(4): p. 205-17.
288. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood*. Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 96-102.
289. Ciriaco, E., et al., *Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius)*. Microsc Res Tech, 2003. **62**(6): p. 482-7.
290. Cihak, J., et al., *In vivo depletion of chicken T-cell subsets*. Scand J Immunol, 1993. **38**(2): p. 123-9.
291. Clurman, B.E. and W.S. Hayward, *Multiple proto-oncogene activations in avian leukosis virus-induced lymphomas: evidence for stage-specific events*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(6): p. 2657-64.
292. Ekino, S., et al., *Role of environmental antigen in the development of IgG+ cells in the bursa of fabricius*. J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4551-8.
293. Sorvari, R., A. Naukkarinen, and T.E. Sorvari, *Anal sucking-like movements in the chicken and chick embryo followed by the transportation of environmental material to the bursa of Fabricius, caeca and caecal tonsils*. Poult Sci, 1977. **56**(5): p. 1426-9.
294. Sorvari, R. and T.E. Sorvari, *Bursa Fabricii as a peripheral lymphoid organ. Transport of various materials from the anal lips to the bursal lymphoid follicles with reference to its immunological importance*. Immunology, 1977. **32**(4): p. 499-505.
295. Ratcliffe, M.J., *Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 101-18.
296. Gares, S.L., et al., *Immunotargeting with CD154 (CD40 ligand) enhances*

- DNA vaccine responses in ducks.* Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(8): p. 958-65.
297. Manoj, S., et al., *Targeting with bovine CD154 enhances humoral immune responses induced by a DNA vaccine in sheep.* J Immunol, 2003. **170**(2): p. 989-96.

10 Anhang

A Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4, Material und Methoden integriert.

- | | |
|----|---|
| 1 | Applichem, Darmstadt |
| 2 | Biochrom, Berlin |
| 3 | Ratiopharm, Ulm |
| 4 | Invitrogen, Karlsruhe |
| 5 | Sigma, Deisenhofen |
| 6 | GE Healthcare, München |
| 7 | Macherey-Nagel, Düren |
| 8 | Promega, Mannheim |
| 9 | Fermentas, St. Leon-Rot |
| 10 | Roth, Karlsruhe |
| 11 | Solis BioDyne, Tartur/Estland |
| 12 | Biontex, München |
| 13 | Merck, Darmstadt |
| 14 | Stereospecific Detection Technologies, Baesweiler |
| 15 | Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham/USA |
| 16 | Nunc, Wiesbaden |
| 17 | Dianova, Hamburg |
| 18 | Becton Dickinson, Heidelberg |
| 19 | Becman Coulter, Krefeld |
| 20 | Hartenstein Laborbedarf, Würzburg |
| 21 | Linaris, Wertheim-Bettingen |

B Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Brutschrank	MCO-5AC	Sanyo, München
Durchflusszytometer	FACS Calibur Software: CellQuest, FlowJo	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA Washer	Atlantis 2	Asys, Dornstadt
Gelkammer	Sub Cell GT	BioRad, München
Gel Dokumentation	Image Quant 300 Software: Image Quant Capture 300	GE Healthcare, Garching
Kryotom	HM500 OM	Microm/Thermo Scientific, Walldorf
Mikroskop	Leica DMIL Kamera: DFC340FX	Leica, Bensheim
Mikroskop	Axiovision Kamera: AxioCam MRC5	Zeiss, Jena
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Köln
Photometer Küvette	Spectrophotometer Quartz-Küvette	Sigma, Deisenhofen
Plattenphotometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Power-Supply	Power Pac 300	BioRad, München
Schleifwerkzeug	Dremel MultiPro	Dremel, Leinfelden-Echterdingen
Schüttelinkubator	Schüttler KS15A mit Inkubatorhaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Sicherheitswerkbank	Hera Safe HS12	Heraeus Instruments, München
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen
Szintillationsmessgerät	TopCount, 6-Detector,	PerkinElmer, Monza, Italien
Thermocycler	MJ Mini	BioRad, München
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Köln

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers, für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu können. Dank seiner Unterstützung war es möglich ein Stipendium der Bayerischen Eliteförderung zu erhalten.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Sonja Kothlow, die diese Arbeit mitbetreute. Sie war stets bestrebt die Arbeit durch ihr fachliches Wissen und konstruktive Kritik voranzubringen. Sie hatte jederzeit ein offenes Ohr für Probleme aller Art.

Beide hatten durch ihre kollegiale Betreuung nicht nur wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit, sondern sie vermittelten mir darüber hinaus auch große Freude am wissenschaftlichen Arbeiten.

Bei Herrn Prof. Dr. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein besonderer Dank gilt der Universität Bayern, welche mir im Rahmen der Bayerischen Eliteförderung ein Stipendium zu Verfügung stellte.

Auch möchte ich mich beim Graduiertenkolleg „Funktionale Genomforschung in der Tiermedizin“ bedanken, an das ich während meiner Promotion assoziiert war. Es war von großem Wert, die Arbeit wiederholt vor dem Kolleg zu präsentieren und Rat sowie konstruktive Kritik aus anderen Blickwinkeln zu erhalten.

Für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Antikörpern und Zytokinen danke ich Prof. John Young vom Institute for Animal Health in Compton, UK.

Bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Kaspers möchte ich mich herzlich für freundschaftliche Atmosphäre bedanken. Besonderer Dank gilt hier Beatrice Schaerer, die mir bei FACS-Analysen hilfreich zur Seite stand sowie Marina Kohn und Verena Poschenrieder, die mich bei ELISA-Experimenten unterstützten.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Mitdoktoranden: Ute Breithaupt, Susi Hainke, Julia Korte, Carsten Krohmann, Stefan Schmieder und Magdalena Schumacher sowie allen anderen Doktoranden des Instituts. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Labornachbarn Benni Schusser, der mir manch nützliche Anregung gab und auf dessen Hilfe ich immer zählen konnte.

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Hedi Opitz, Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka.

Meinen Eltern danke ich für die fortwährende Unterstützung während Studium und Promotion. Monika Pertl und Heidi Aicher danke ich für ihre persönliche Unterstützung während dieser Zeit.

Schließlich möchte ich noch meinem Mann Bernhard „Kröte“ Schenk danken, der mir immer ein großer Rückhalt war und mich stets motiviert und aufgemuntert hat.